



Rafael Mestre Mamede

Licenciado em Química Aplicada

**Estratégias sintéticas para a preparação
de análogos do alcalóide cernumidina**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica**

Orientadora: Paula Branco, Professora auxiliar, FCT/UNL

Co-orientadora: Ana Lourenço, Professora auxiliar, FCT/UNL

Outubro, 2016



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Rafael Mestre Mamede

Licenciado em Química Aplicada

**Estratégias sintéticas para a preparação de
análogos do alcalóide cernumidina**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica**

Orientadora: Paula Branco, Professora auxiliar, FCT/UNL

Co-orientadora: Ana Lourenço, Professora auxiliar, FCT/UNL

Estratégias sintéticas para a síntese de análogos do alcalóide cernumidina

Copyright © Rafael Mestre Mamede, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Começo por dirigir os meus agradecimentos à professora Paula Branco, minha orientadora, pelos conhecimentos que me transmitiu, pela paciência que teve, por o apoio que me deu e por o modelo que é como professora. Tal como à professora Ana Lourenço, minha co-orientadora, pela disponibilidade e apoio que me concedeu durante a tese.

Dirijo agradecimentos também à professora Luísa Ferreira e à Patrícia Máximo, pelas contribuições e sugestões para o desenvolvimento do trabalho, bem como a todo o pessoal dos laboratórios 202 e 205 do departamento de química.

Relativamente ao serviço de RMN gostaria de agradecer à Doutora Ana Teresa Lopes. Os espectrómetros de RMN fazem parte da “The National RMN Facility” com o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (RECI/BBBQB/0230/2012).

Um agradecimento final, em especial, aos meus pais e aos meus amigos que a meu lado sempre demonstraram apoio incondicional.

Resumo

A cernumidina é um alcalóide natural com uma estrutura de carboxamidina condensada com uma unidade de ácido isoferúlico que foi isolada a partir do extrato alcoólico das folhas de *Solanum cernuum Vell.*

O trabalho teve como objetivo sintetizar a cernumidina e análogos. Numa primeira abordagem usou-se a 2-pirrolididona como material de partida, tendo-se descartado esta via sintética pois não se obtiveram os resultados esperados. Decidiu-se, então, usar a L-prolina como material de partida com proteção apropriada do átomo de azoto tendo como passo chave na síntese a derivatização à acil azida e posterior rearranjo de Curtius ao isocianato correspondente. A condensação deste intermediário com bromoestireno ou derivados validou esta estratégia sintética. Aplicando esta via sintética à L-prolina protegida com o grupo carbodiimida foi possível a preparação de um possível composto análogo do alcalóide cernumidina mas cuja completa elucidação estrutural carece de mais estudos por RMN e EM. Com esta metodologia foi possível a síntese do núcleo C4-N-aminoguanidina baseado na prolina que pode vir a ser usado em organocatálise. Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de IV, ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, e espectrometria de massa.

Abstract

Cernumidine is a natural alkaloid, with a condensed carboxamidine structure and isoferulic acid unit, that was isolated from the extract of leaves of *Solanum cernuum Vell.* This study aimed to synthesize cernumidine and derivatives. The first approach used 2-pyrrolidinone as starting material, which was discarded due to the unexpected obtained results. Therefore, the use of L-proline as starting material with appropriate protection of the nitrogen atom and its derivatization to acyl azide and subsequent Curtius rearrangement were the key steps in this strategic approach. Condensation of the isocyanate with bromostyrene and derivatives validated this synthetic strategy. Applying this synthetic route to L-proline protected with the carbodiimide group led to the preparation of cernumidine derivatives which will be subjected to biological activity studies of IL-8 production. With this methodology, the synthesis of C4-N aminogunidine core based on L-proline was possible and it might be used in organocatalysis. The compounds were characterized by IR spectroscopy, NMR and mass spectrometry.

Abreviaturas

Δ	Aquecimento
δ	Desvio químico
ν	Número de onda (cm ⁻¹)
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
BSTFA	N,O-di(trimetilsilil) trifluoracetamida
c.c.f	Cromatografia em camada fina
CDI	Carbonilo diimidazole
d	duplete
DCC	1,3-Diciclo-hexilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
eq	Equivalente molar
ESI	Ionização por eletrospray
GC	Cromatografia gasosa
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações
HMQC	Correlação heteronuclear de quantum simples
IL-8	Interceulina-8
IV	Infra-vermelho
J	Constante de acoplamento
m	multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MOM	Metóximetil
MS	Espetrometria de massa
NBS	<i>N</i> -bromo succinamida
NMM	<i>N</i> -metil morfolina
ppm	Partes por milhão
R _f	Factor de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	singuleto
t	tripleto
TFA	Ácido trifluoracético

Índice de matérias

Agradecimentos	v
Resumo.	vii
Abstract.....	ix
Abreviaturas.....	xi
Índice de matérias	xiii
Índice de Figuras.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1 Uso de produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos	1
1.2 Cernumidina.....	1
1.3 Quiralidade/Síntese Assimétrica.....	2
1.4 Formação de amidas	3
1.4.1 Por reações entre ácidos carboxílicos e aminas	3
1.4.2 Por adição de organometálicos a isocianatos	5
1.4.2.1 Formação de isocianatos – O rearranjo de Curtius	6
1.4.3 A reação de Schotten-Baumann	7
1.5 Síntese de guanidinas	8
1.6 Análise retrosintética.....	9
2. Discussão de resultados.....	11
2.1 Preâmbulo	11
2.2 Metodologia adotada partindo da 2-pirrolidona	12
2.2.1 Proteção do átomo de azoto da 2-pirrolidona	12
2.2.2 Síntese de 2-etoxipirrolidina-1-carboxylato de <i>tert</i> -butilo (8) ...	14
2.3 Metodologia adotada partindo da L-prolina	16
2.3.1 Reacções de derivatização da L-prolina.....	16

2.3.1.1	Proteção com <i>tert</i> -butil-carbonato.....	16
2.3.1.2	Inserção do grupo carbodiimida	20
2.4	Síntese de acil azidas	23
2.4.1	Partindo da Boc-prolina (3).....	23
2.4.1.1	Envolvendo a formação de éster de ácidos carboxílicos	24
2.4.1.2	Envolvendo a formação de anidridos mistos	25
2.5	Síntese de Isocianatos por Rearranjo de Curtius.....	30
2.6	Conversão de <i>N</i> -Boc-carbamoil-prolina (11) na acil azida (15).....	32
2.7	Reação de isocianatos com nucleófilos.....	33
2.7.1	Reação com alcóois – formação de carbamatos.....	33
2.7.2	Reação com nucleófilos de carbono – formação de amidas	34
2.8	Formação da ligação amida por reação de condensação com derivados de ácidos carboxílicos.....	36
2.9	Reacções de <i>N</i> -Boc-carbamoil-2-(azidocarbonil)prolina (15).....	39
2.9.1	Conversão in situ à amina e reação com cloreto de benzoílo	39
2.10	Reação de desproteção – remoção do grupo Boc.....	40
2.11	Reação de inserção do grupo carbodiimida no composto 23	40
2.12	Preparação de reagentes de Grignard	41
2.12.1	Proteção do átomo de oxigénio do ácido isoferúlico	42
2.12.2	Halodescarboxilação	43
2.12.2.1	Síntese de (<i>E</i>)-4-(2-bromovinil)-1-metoxi-2-(metoximetoxi)benzeno (25).....	43
2.12.2.2	Síntese de (<i>E</i>)-1-(2-bromovinil)-4-metoxibenzeno (27).....	
2.13	Conclusões	46
3.	Parte experimental.....	49
3.1	Preâmbulo	49

3.2	Reação de proteção da 2-pirrolidona	50
3.2.1	Síntese de <i>N-terc</i> -butil 1-carboxilato-2-oxopirrolidina (7)	50
3.3	Síntese de 2-etoxipirrolidina-1-carboxilato de <i>terc</i> -butilo (8)	51
3.4	Reação de N-derivatização da L-prolina.....	51
3.4.1	Síntese de <i>N-terc</i> -butiloxycarbonil-S-prolina (3)	51
3.4.2	Síntese de <i>N,N'</i> -di(<i>terc</i> -butiloxycarbonil)carbamimidoil-L-prolina (<i>N</i> -Boc-carbamoyl-prolina, 11)	52
	Reação de metilação <i>N-terc</i> -butiloxycarbonil-S-prolina:.....	53
3.5	Síntese de <i>S</i> -pirrolidina-1,2-dicarboxilato de 2-metilo 1- <i>terc</i> -butilo (<i>N</i> - Boc-prolina metil éster, 13)	53
3.6	Síntese de <i>terc</i> -butil-1-carboxilato 2- <i>S</i> -azidocarbonil pirrolidina (12). 54	
3.7	Síntese de <i>terc</i> -butil-1-carboxilato 2- <i>S</i> -isocianatopirrolidina (14)	55
	Reações de <i>terc</i> -butil-1-carboxilato 2- <i>S</i> -isocianatopirrolidina (14):	56
3.8	Síntese de <i>terc</i> -butil-1-carboxilato 2- <i>S</i> - ((amino)carbonil)cinamiloxi)pirrolidina (16)	56
3.9	Hidrólise do isocianato a amina e reações de N-acilação	56
3.9.1	Síntese de <i>N-terc</i> -butil 1-carboxilato-(<i>E</i>)-2(3-(3-hidroxi-4- metoxifenil)acrilamida)pirrolidina (20).....	56
3.9.2	Síntese de <i>terc</i> -butil-1-carboxilato 2-(3-(4- metoxifenil)acrilamida)pirrolidina (20a).....	57
3.10	Reações de Grignard	58
3.10.1	Síntese de <i>N-terc</i> -butil 1-carboxilato-2-benzamidopirrolidina (17).....	58
3.10.2	Síntese de <i>N-terc</i> -butil-1-carboxilato-2-cinamamidopirrolidina (18).....	59
3.11	Reação de remoção do grupo protetor Boc: Síntese de 2- Benzamidopirrolidina (23).....	60

3.12	Síntese de N- <i>terc</i> -butil (E)-((2-benzamidopirrolidin-1-il)((<i>terc</i> -butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (22)	60
3.13	Preparação de reagentes de grignard	62
	Reação de proteção do grupo hidroxilo:	62
3.13.1	Síntese de ácido (E)-3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acrílico (25).....	62
3.13.2	Reações de halodescarboxilação	62
3.13.2.1	Síntese de (E)-4-(2-bromovinil)-1-metoxi-2-(metoximetoxi)benzeno(26).....	62
3.13.2.2	Síntese de (E)-1-(2-bromovinil)-4-metoxibenzeno (28)	63
3.13.2.3	Síntese de (E)-5-(2-bromovinil)-2-metoxifenol (27)	64
3.13.3	Síntese de brometo de estireno magnésio (30).....	64
3.13.3.1	Titulação de reagentes de Grignard.....	64
4.	Bibliografia.....	65

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Estrutura da Cernumidina (1).....	1
Figura 1.2 - Efeitos de inibição em IL-8 da cernumidina (1) em células HT-29 (Eixo Vertical-% de inibição IL-8; Eixo Horizontal-concentração de 1 (μM)) ...	2
Figura 1.3 - Mecanismo da formação de ligação amida com uso de CDI.....	4
Figura 1.4 - Mecanismo da formação de ligação amida com uso de DCC.....	4
Figura 1.5 - Método de preparação de amidas por adição de organometálicos a isocianatos.....	5
Figura 1.6 - Mecanismo de adição de reagente de Grignard a isocianato	5
Figura 1.7 - Formação de acil azidas e isocianatos	6
Figura 1.8 - Rearranjo de Curtius	6
Figura 1.9 – Reações do isocianato.....	7
Figura 1.10 - Hidrólise de isocianato.....	7
Figura 1.11 - Mecanismo da reação de Schotten-Baumann	7
Figura 1.12 – Espécie amidina, GP: Boc, X: SMe	8
Figura 1.13 - Análise retrossintética da Cernumidina A	9
Figura 2.1 - Esquema geral da metodologia sintética (Vias B e C) adoptada para a preparação da Cernumidina e análogos partindo da L-prolina.	11
Figura 2.2 - Esquema geral da metodologia sintética (Via A) adoptada para a preparação da Cernumidina e análogos partindo da 2-pirrolidona.....	12
Figura 2.3 - Síntese de 2-oxopirrolidin-1-carboxilato de <i>terc</i> -butilo (7).....	12
Figura 2.4 - Mecanismo proposto para proteção de 2-pirrolidona com Boc ₂ O..	13
Figura 2.5 – Estrutura dos dois rotâmeros do composto 7.	14
Figura 2.6 - Síntese de 2-etoxipirrolidina-1-carboxilato de <i>terc</i> -butilo (8)	14

Figura 2.7 - Mecanismo proposto para redução do composto 7 ao composto 8.	15
Figura 2.8 - Síntese de N- <i>terc</i> -butiloxicarbonil-S-prolina (3)	16
Figura 2.9 - Mecanismo proposto para proteção da L-Prolina com Boc ₂ O.....	17
Figura 2.10 - Espectros de RMN (a) ¹ H e b) ¹³ C) do composto 3 em CDCl ₃	18
Figura 2.11 - Rotação intramolecular do composto 3.....	19
Figura 2.12 -Fragmentações propostas para os picos observados no espectro de GC-MS do composto 3 (a) e do composto 3 siliado com N,O-di(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA) (b)	20
Figura 2.13 - Síntese de N,N'-di(<i>terc</i> -butiloxicarbonil)carbamimidoil-S-prolina (N-Boc-carbamoil-prolina, 11)	20
Figura 2.14 - Mecanismo proposto para inserção do grupo carbodiimida e formação de 11.	21
Figura 2.15 - Espectro a) ¹ H-RMN b) ¹³ C em acetona-d ⁶ do composto 11 com o espectro de DEPT inserido	22
Figura 2.16 - Espectro de ESI do composto 11	23
Figura 2.17 – Metodologias adotadas para a preparação de acil azidas.	23
Figura 2.18 - Mecanismo proposto para a preparação de cil azidas envolvendo a formação de ésteres.....	24
Figura 2.19 - Mecanismo proposto para a formação da acil azida (12) envolvendo o anidrido misto	26
Figura 2.20 – Espectros de ¹ H-RMN de 12 em CDCl ₃ (1-efetuado após 10 min, 2-efetuado após 4h, 3-efetuado após cerca de 24h)	27
Figura 2.21 - GC-MS da acil azida (12) e a) após aquecimento da reação em água.	28
Figura 2.22 - Transformação da acil azida no correspondente isocianato. Preparação de de <i>terc</i> -butil-1-carboxilato 2-S-isocianato de pirrolidina (14)	28
Figura 2.23 - Fragmentações propostas para os picos observados no GC-MS da Fig 2.21.....	29

Figura 2.24 - Mecanismo proposto para formação de 14	30
Figura 2.25 – Espetros de IV para formação de isocianato ao longo de 4h em THF a 45° C (a) ao fim de 20 min, b) após 4 h)	31
Figura 2.26 - Espetro de ¹ H-RMN do composto 14 em CDCl ₃	31
Figura 2.27 - Espetros de IV para formação de isocianato ao longo de 30 min (Tolueno – 65° C)	32
Figura 2.28 - Síntese de N-Boc-carbamoyl-2-(azidocarbonil)prolina (15) a) NMM, cloroformiato de isobutilo, depois KH ₂ PO ₄ e azida de sódio.	32
Figura 2.29 – Previsível reação entre o isocianato (14) e o álcool cinâmico com vista à obtenção de <i>tert</i> -butil-1-carboxilato 2-S-((amino)carbonil)cinamiloxi)pirrolidina (16).....	33
Figura 2.30 - Síntese <i>tert</i> -butil 1-carboxilato-2-benzamidopirrolidina (17)	34
Figura 2.31 – Expansão de espectro COSY do composto 17 em CDCl ₃	35
Figura 2.32 - Síntese <i>tert</i> -butil 1-carboxilato-2-cinamamidopirrolidina (18)....	36
Figura 2.33 - Síntese de <i>tert</i> -butil 1-carboxilato-(E)-2(3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilamida)pirrolidina (20) precursor da Cernumidina.	37
Figura 2.34 – Mecanismo proposto para a formação do composto 20.....	38
Figura 2.35 - di- <i>tert</i> -butil 2,2'-carbonil bis(azonediil))bis(pirrolidina-1-carboxilato) (21)	38
Figura 2.36 - Síntese de N'-benzil-N-Boc-carbamoyl-prolina (22).	39
Figura 2.37 - Síntese de 2-benzamidopirrolidina (23).....	40
Figura 2.38 - Síntese do composto 22 por inserção do grupo carbodiimida	41
Figura 2.39 - Esquema geral da metodologia sintética adotada para a preparação de reagentes de grignard	42
Figura 2.40 – Síntese de ácido (E)-3-(4-metoxi-(dimetoxi)fenil)acrílico 24.....	42
Figura 2.41 - Síntese de (E)-4-(2-bromovinil)-1-metoxi-2-(metoximetoxi)benzeno 26	43

Figura 2.42 - Síntese do composto 26 iniciando-se por a halodescarboxilação de 24	44
Figura 2.43 – Mecanismo proposto para a reação catalítica de Hunsdiecker	45
Figura 2.44 - Síntese do (E)-1-(2-bromovinil)-4-metoxibenzeno (28).....	45

1. Introdução

1.1 Uso de produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos

O estudo de produtos naturais, principalmente provenientes de plantas, serviram como base para a descoberta dos primeiros fármacos, como por exemplo a aspirina (ácido acetilsalicílico), derivada da salicina que foi isolada do salgueiro-branco (*Salix alba*), ou a morfina isolada a partir da papoila-dormideira (*Papaver somniferum*).¹ Ainda hoje em dia, os produtos naturais continuam a ser uma importante fonte na investigação de novos agentes bioativos, uma vez que apenas cerca de 10% da biodiversidade foi testada para potencial atividade biológica. Sendo assim, muitos compostos aguardam ainda a sua descoberta.^{2,3}

1.2 Cernumidina

A cernumidina (**1**) (Fig. 1.1) é um alcalóide natural com uma estrutura carboxamidina condensada com uma unidade de ácido isoferúlico que foi isolada a partir de extrato de folhas secas da *Solanum cernuum* Vell. Esta planta é nativa do Brasil e cresce espontaneamente nos estados de Rio de Janeiro e Minas Gerais. É usada na medicina tradicional através de infusões das partes aéreas no tratamento de inúmeras patologias, como por exemplo úlceras gástricas, lesões hepáticas, infecções dermatológicas, e também usada como agente antitumoral.^{4,5}

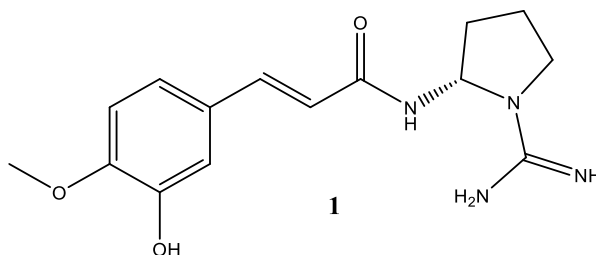


Figura 1.1 – Estrutura da Cernumidina (**1**)

Este composto (**1**) apresenta uma estrutura particular devido à presença da unidade carboxidimina-2-aminopirrolidin-1-il associada a este tipo de ácido cinâmico por ligação amida, a qual não estava ainda descrita na literatura.⁴

Estudos de atividade biológica mostraram que a cernumidina (**1**) apresenta inibição da interleucina-8 (IL-8) pelas células HT-29 do carcinoma do cólon. Estudos *in vitro* demonstraram que ocorre uma diminuição de IL-8 na presença do composto **1** de 50% para uma concentração de 50 μ M (Fig. 1.2).⁴

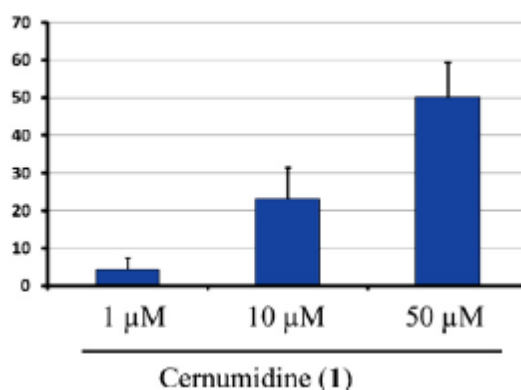


Figura 1.2 - Efeitos de inibição em IL-8 da cernumidina (**1**) em células HT-29 (Eixo Vertical-% de inibição IL-8; Eixo Horizontal-concentração de **1** (μ M))⁴

1.3 Quiralidade/Síntese Assimétrica

A quiralidade, propriedade geométrica de moléculas na qual um composto se diz quiral quando a sua imagem não é sobreponível à imagem espelhada, foi descoberta por Louis Pasteur, quando pela primeira vez, em 1848, separou dois isómeros do ácido tartárico. O facto de um composto apresentar quiralidade significa que pode existir como dois enantiómeros – moléculas que são imagens no espelho uma da outra e não são sobreponíveis, nem por rotação, nem por translação. A mistura de 1:1 de enantiómeros numa solução denomina-se mistura racémica. Na indústria farmacêutica, cerca de 56% de todos os fármacos em circulação são produtos quirais, dos quais 88% destes são misturas racémicas. Os enantiómeros apesar de apresentarem a mesma estrutura química apresentam diferentes atividades biológicas, e por tal é essencial o desenvolvimento de metodologias para a preparação de compostos enantiomericamente puros. Os requisitos da indústria farmacêutica são nesta área extremamente rigorosos. Uma das características dos compostos quirais é possuírem atividade ótica – capacidade de rodar o plano da luz polarizada, em que o par de enantiómeros pode ser classificado como levógiro (isómero

- L) e dextrógiro (isómero – D), dependendo se rodam a luz polarizada para a esquerda (-) ou direita (+). Em suma, os enantiómeros, apresentam a mesma estrutura química e propriedades físicas iguais, mas ao diferirem no arranjo espacial dos seus átomos apresentam diferença na rotação do plano da luz polarizada, do mesmo valor, mas em sentidos opostos, assim como na reatividade com outros compostos quirais.⁶

Até ao início da década de 80 do século passado, a síntese de compostos enantiomericamente puros assentava na resolução de racematos, através do uso de um composto opticamente puro que não era consumido, e tal levava ao isolamento do enantiómero desejado com um alto grau de pureza, mas sempre com um rendimento máximo de 50%. Hoje em dia, podemos recorrer a diferentes abordagens, tal como o uso de produtos naturais, e de síntese, enantiomericamente puros, reagentes quirais, auxiliares quirais, e catalisadores quirais.⁷

1.4 Formação de amidas

As ligações carboxiamidas são neutras, estáveis e possuem propriedades aceitadoras e doadoras de protões.⁸ Tendo em atenção que são variadíssimos os métodos de preparação de amidas iri-se-á aqui referir apenas aqueles que são relevantes para o estudo em questão.

1.4.1 Por reações entre ácidos carboxílicos e aminas

As amidas podem ser formadas por reação entre ácidos carboxílicos e aminas. No entanto sendo o grupo hidroxilo um mau grupo abandonante, terão que ser usados reagentes de acoplamento. O processo clássico envolve a reação de cloreto de acilo com aminas sem a necessidade de recorrer a reagentes de acoplamento, pois os cloretos de acilo são espécies muito mais reativas do que ácidos carboxílicos.⁶

O carbonilo diimidazole (CDI) é um reagente de acoplamento que permite a formação de ligação amida. As espécies imidazole e carboxi-acil-imidazole são formadas inicialmente como resultado da reação do ácido carboxílico e o CDI. A formação da amida dá-se posteriormente na reação da amina com o intermediário carboxi-acil-imidazole. Os produtos laterais desta reação (CO₂ e imidazole) são inócuos e a

racemização do substrato tende a ser mínima, devido ao uso de condições suaves (Fig. 1.3).⁸

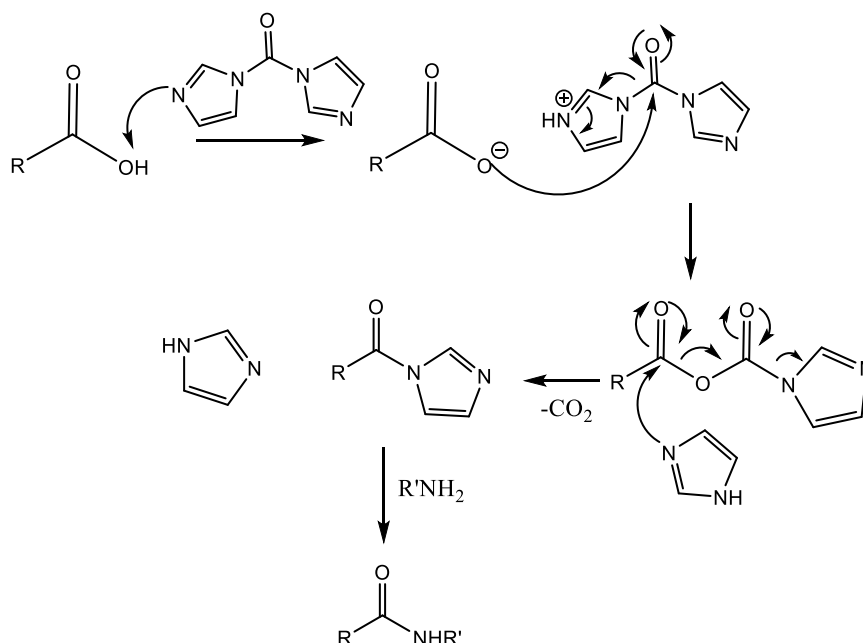


Figura 1.3 - Mecanismo da formação de ligação amida com uso de CDI

A N,N' -diciclohexilcarbodiimida (DCC) é um outro reagente de acoplamento muito usado que permite a ativação do ácido carboxílico através da formação de um éster. Ao adicionar-se uma espécie nucleofílica, como uma amina, ocorre a expulsão de um derivado de ureia estável, e a formação da ligação amida entre o ácido e a amina (Fig. 1.4).⁶

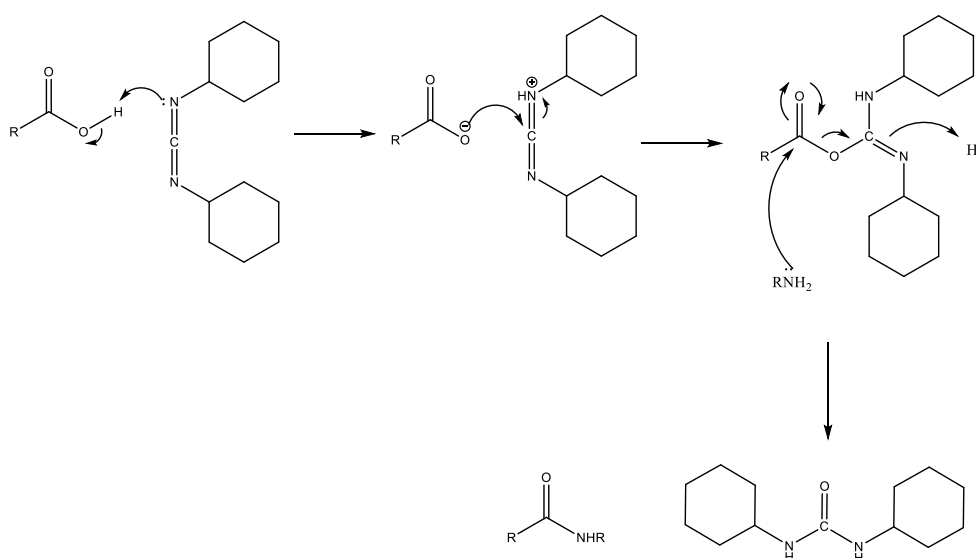


Figura 1.4 - Mecanismo da formação de ligação amida com uso de DCC

1.4.2 Por adição de organometálicos a isocianatos

A adição de organometálicos, por exemplo reagentes de Grignard a isocianatos é um dos métodos de preparação de amidas descrito na literatura (Fig. 1.5).⁹

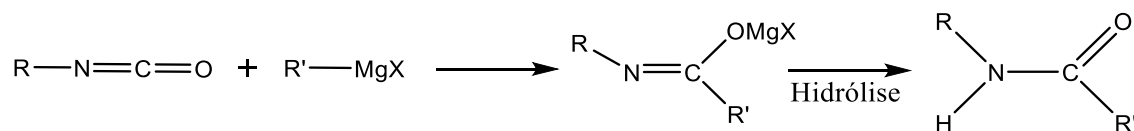


Figura 1.5 - Método de preparação de amidas por adição de organometálicos a isocianatos

Apesar dos isocianatos possuírem mais do que um grupo reativo ($-\text{N}=\text{C}=$ e $=\text{C}=\text{O}$) aos quais o reagente de Grignard se pode ligar, Blake demonstrou que os produtos formados são amidas. Tanto o mecanismo I (ligação MgBr ao átomo de azoto), como o mecanismo II (ligação ao átomo de oxigénio), explicam o modo de adição do Grignard e o produto final (Fig. 1.6).¹⁰

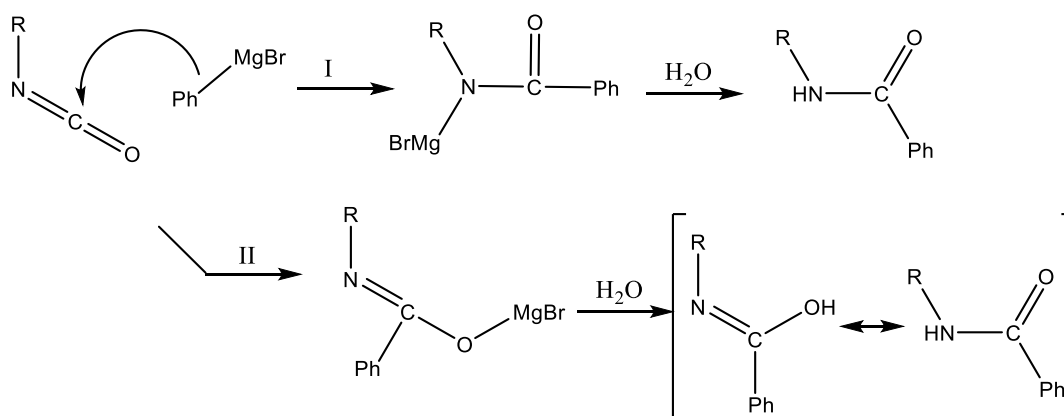


Figura 1.6 - Mecanismo de adição de reagente de Grignard a isocianato

De forma a se elucidar o mecanismo, os autores fizeram uma série de experiências em que adicionaram brometo de fenilmagnésio, tratado com sulfato de di-metilo e sulfato de di-etilo, a isotiocianato de fenilo. A reação ocorre em ambos os casos e os produtos formados são *S*-metil-tiobenzanilida e *S*-etil-tiobenzanilida, respectivamente. O que leva a crer que a reação ocorre na ligação $\text{C}=\text{S}$, e devido às semelhanças entre isocianatos e tioisocianatos, pode supor-se que a reação para isocianatos ocorra na ligação $\text{C}=\text{O}$ (Mecanismo II).¹⁰

A preparação de isocianatos pode ser conseguida pelo rearranjo de Curtius; reação orgânica usada para converter uma acil azida em isocianato sob aquecimento.

1.4.2.1 Formação de isocianatos – O rearranjo de Curtius

O rearranjo de Curtius começa com uma acil azida, a qual pode ser obtida numa substituição nucleófila de um cloreto de acilo com azida de sódio. Alternativamente, pode ser usado um éster ou anidrido misto que na reação com azida de sódio (NaN_3) leva à formação de acil azida, sob condições apropriadas (Fig. 1.7).^{8,11–13}

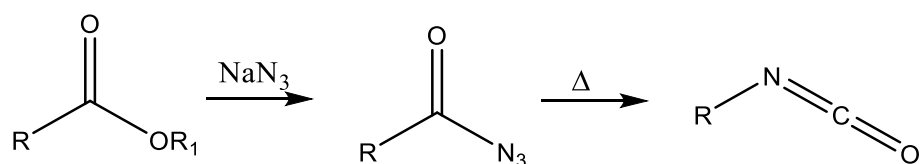


Figura 1.7 - Formação de acil azidas e isocianatos

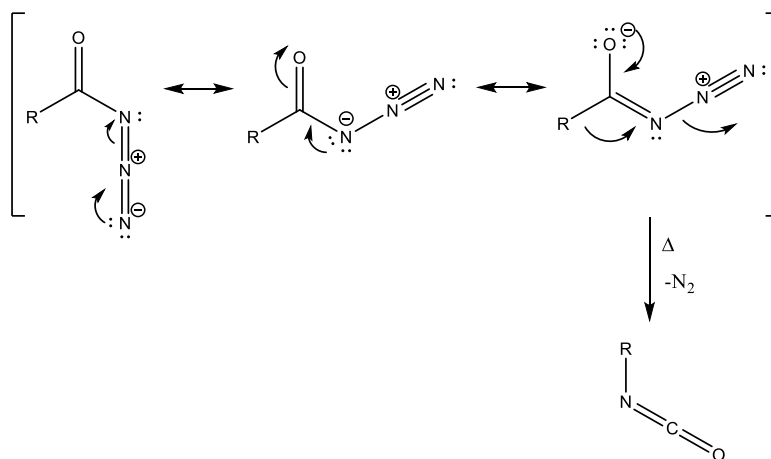


Figura 1.8 - Rearranjo de Curtius

Alguns autores apontam para que o mecanismo do rearranjo de Curtius seja um processo concertado, que consiste na transferência do grupo R ligado ao carbono carboxílico para o átomo de azoto, representado na figura 1.8. Durante o rearranjo ocorre a libertação de azoto gasoso que desempenha a função de força motriz para a formação do isocianato. A migração sucede-se com a retenção total da configuração do grupo R.^{11,14,15} Como produto da reação de rearranjo é obtido o isocianato o qual é usado para reações posteriores (Fig 1.9) de entre as quais, na reação com organometálicos se obtêm amidas.

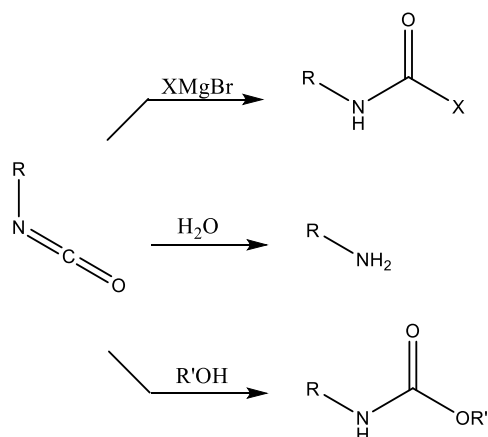


Figura 1.9 – Reações do isocianato

A reação de água com isocianatos implica a formação inicial de um ácido carbâmico. Este intermediário é instável, e a sua decomposição gera dióxido de carbono e a amina (Fig. 1.10).

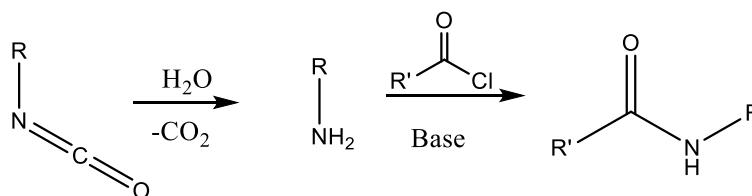


Figura 1.10 - Hidrólise de isocianato

1.4.3 A reação de Schotten-Baumann

A reação de Schotten-Baumann permite formar uma ligação amida a partir de uma amina e um cloreto de ácido, com recurso a uma base que permite a neutralização do meio ácido formado por libertação de HCl de forma a deslocar o equilíbrio para a formação da amida.^{16,17} Na Figura 1.11 é apresentado o mecanismo da reação.

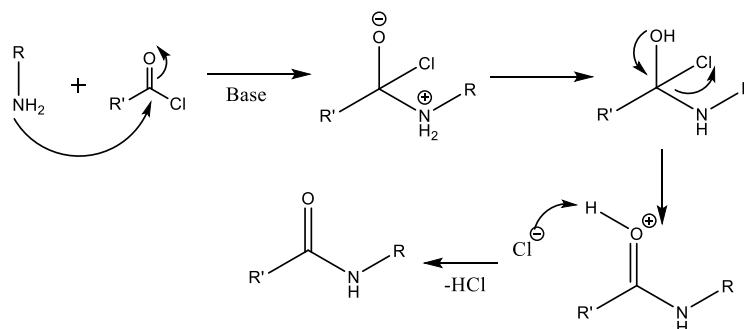


Figura 1.11 - Mecanismo da reação de Schotten-Baumann

1.5 Síntese de guanidinas

A guanidina e derivados são um importante grupo funcional em muitos compostos bioativos devido ao seu caráter básico que em condições fisiológicas se apresentam protonados. As cargas positivas podem formar interações entre ligando e recetor ou enzima e substrato através de ligações por ponte de hidrogénio e interações electrostáticas.¹⁸ Daí moléculas bioativas que contenham este grupo funcional e procedimentos experimentais que as permitam sintetizar em laboratório sejam alvo recorrente estudo.¹⁹

Maioritariamente a síntese de compostos com derivados de guanidina envolve a reação entre uma amina com uma espécie eletrofílica de carbomimida, representada na figura 1.12 Os reagentes mais usados são a carboxamidina-1-pirazole, ou *S*-alquil tioureias e derivados.¹⁹

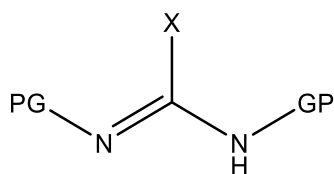


Figura 1.12 – Espécie amidina, GP: Boc, X: SMe

A preparação de guanidinas com grupos de proteção apropriados (por exemplo Boc) torna estes derivados menos polares e menos básicos facilitando o uso em reações e posteriores purificações por cromatografia.²⁰ Sendo que neste trabalho usou-se a 1,3-di-(*tert*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudoureia.

1.6 Análise retrossintética

A retrossíntese da cernumidina (**1**) pode ser analisada por duas vias (Fig 1.13): a via a) em que se procede a uma retro inserção do grupo carbodiimida, seguido de uma clivagem da ligação amida originando o ácido iso-ferúlico e a 2-amino-pirrolidina, que tem como equivalente sintético a L-prolina através de interconversão de grupo funcional; a via b) na qual uma rutura da ligação C-N do grupo amida origina o ácido iso-ferúlico e 2-amino-pirrolidina-1-carboxidamida, que retrossinteticamente provêm também da L-prolina.

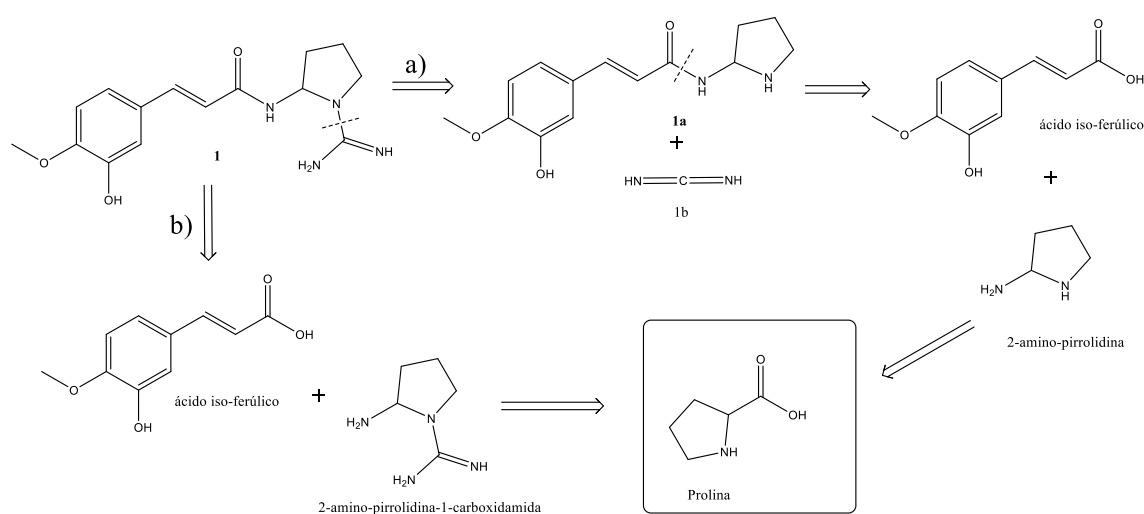


Figura 1.13 - Análise retrossintética da Cernumidina A

Para a síntese da cernumidina (**1**) propõe-se o uso de L-prolina como material de partida sendo necessário o recurso a grupos de proteção apropriados do átomo de azoto e posterior rearranjo de Curtius. A condensação de derivados da L-prolina com análogos do ácido isoferúlico pode ser efetuada segundo procedimentos comuns de acoplamento. Após desproteção do átomo de azoto e introdução do grupo carbodiimida, pode obter-se a cernumidina (**1**).

2. Discussão de resultados

2.1 Preâmbulo

De forma a sintetizar a cernumidina (**1**) e análogos recorreu-se a três vias sintéticas. Numa primeira abordagem iniciou-se este trabalho pelo recurso à 2-pirrolidona, que se irá adiante designar como via **A**. Como esta via demonstrou ser ineficaz optou-se por recorrer como material de partida à L-prolina (**2**), representado na figura 2.1 (Via **B** e **C**). A via **B** e **C** divergem no grupo de proteção do átomo de azoto da L-prolina. Na via **B** realiza-se uma proteção com di-*tert*-butil-dicarbonato para obtenção de **3** e na via **C** optou-se pela introdução direta do grupo carbodiimida formando-se a guanidina **4**. Ambas as vias têm como passo chave o rearranjo de Curtius e armadilha do isocianato intermediário formado **5** ou **6** com um reagente organometálico. De seguida na via **C** a desproteção do grupo guanidina permite obter a cernumidina e análogos. Já a via **B** exige a desproteção do azoto da L-prolina por remoção do grupo Boc seguido de incorporação do grupo carbodiimida para obtenção da guanidina. A discussão desta dissertação inicia-se pela abordagem da via **A** não representada na figura 2.1 e que parte da 2-pirrolidona. Nos capítulos seguintes irão ser abordadas as reações que estiveram por base das vias sintéticas delineadas **B** e **C**.

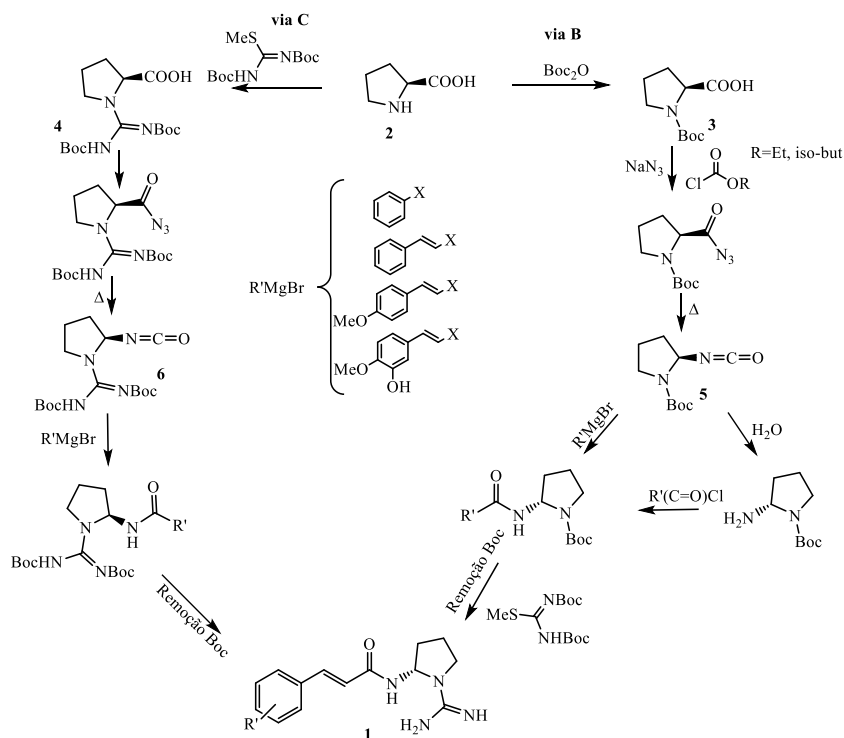


Figura 2.1 - Esquema geral da metodologia sintética (Vias **B** e **C**) adotada para a preparação da Cernumidina e análogos partindo da L-prolina.

2.2 Metodologia adotada partindo da 2-pirrolidona

Partindo da 2-pirrolidona (Via A) a reação de proteção do átomo de azoto com di-*tert*-butil-dicarbonato (Boc_2O) permitiu obter o composto 2-oxopirrolidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7**). Esta via sintética pressupõe a redução posterior de **7** a *N*-*tert*-butoxicarbonil-2-etoxipiperidina (**8**) segundo o processo descrito na literatura por Pilli e Dias.²¹ Idealmente era proposto nesta via sintética (Fig 2.2) a transformação de **8** na azida, redução à amina correspondente e condensação com derivados dos ácidos carboxílicos para a obtenção da cernumidina (**1**) e análogos.

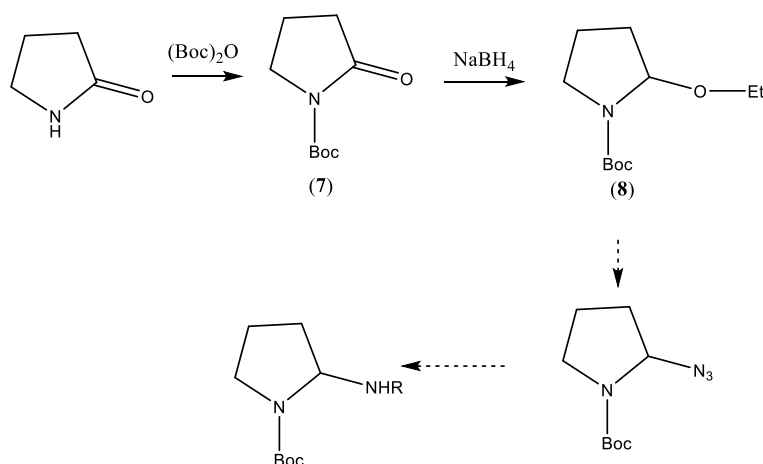


Figura 2.2 - Esquema geral da metodologia sintética (Via A) adotada para a preparação da Cernumidina e análogos partindo da 2-pirrolidona¹⁷

2.2.1 Proteção do átomo de azoto da 2-pirrolidona

Fez-se reagir a 2-pirrolidona com di-*tert*-butil-dicarbonato recorrendo ao uso de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador em acetonitrilo seco e sob atmosfera de azoto de acordo com o procedimento da literatura (Fig 2.3).²¹ A revelação com ácido fosfomolibdico permitiu detetar a ausência de 2-pirrolidona e a formação de 2-oxopirrolidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7**).²²

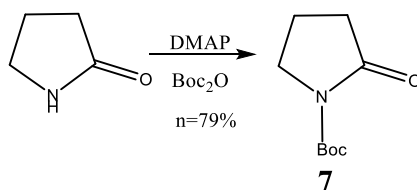


Figura 2.3 - Síntese de 2-oxopirrolidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7**).

Após evaporação do solvente e purificação por coluna cromatográfica obteve-se **7** com um rendimento elevado de 79%. O mecanismo da reação (Fig 2.4) envolve o ataque nucleófilo do grupo amina do DMAP ao átomo de carbono do dicarbonato de forma a catalisar o ataque do grupo amina da 2-pirrolidona ao mesmo e saída do DMAP.

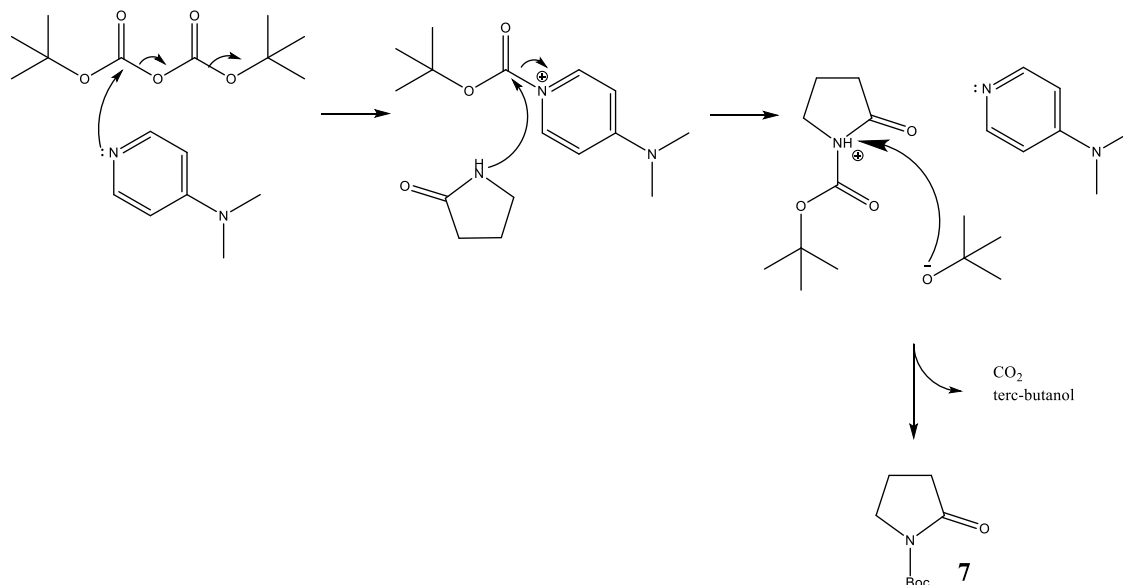


Figura 2.4 - Mecanismo proposto para proteção de 2-pirrolidona com Boc_2O .

A estrutura de **7** foi confirmada por IV e RMN (^1H e ^{13}C). No espectro de IV observa-se bandas características dos grupos carbonilo (1782 e 1713 cm^{-1}), a 2979 cm^{-1} uma banda forte distintiva do estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ da cadeia alifática.

A introdução do grupo Boc na 2-pirrolidona é confirmada no espectro de ^1H -RMN pela presença dos sinais correspondentes aos prótons do grupo *tert*-butilo sob a forma de dois singletos a 1,45 e 1,48 ppm a integrar no total para 9 prótons, tal como no espectro de ^{13}C -RMN para os respetivos átomos de carbono a 27,95 ppm. O átomo de carbono quaternário do grupo *tert*-butilo surge a 82,61 ppm e o átomo de carbono do carbonilo do Boc a 150,13 ppm.

A presença de rotâmeros devido ao caráter de ligação dupla do carbamato (Fig 2.5) é evidenciada no espectro de ^1H -RMN pelos multipletos largos dos sinais do heterociclo assim como pelos dois singletos correspondentes ao grupo *tert*-butilo. Como a frequência de rotação é baixa, o mesmo núcleo pode apresentar-se em ambientes químicos e magnéticos diferentes o que é verificado no espectro de ^1H -RMN.

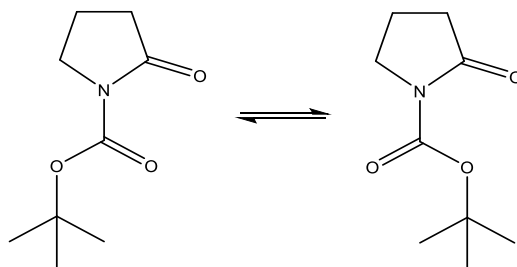


Figura 2.5 – Estrutura dos dois rotâmeros do composto 7.

2.2.2 Síntese de 2-etoxipirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (8)

Adicionou-se borohidreto de sódio a uma solução de 2-etoxipirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (8) em etanol para proceder à redução da função amida segundo procedimento da literatura.^{17,23,24} Efetuou-se várias reações com alterações das condições reacionais (temperatura, equivalentes de borohidreto de sódio, tempo reacional e presença/ausência de prótons acídicos) evidenciado na figura 2.6 e tabela 2.1.

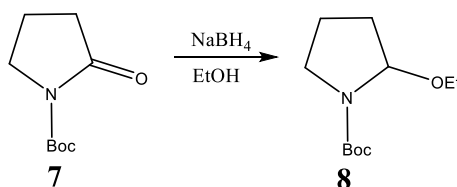


Figura 2.6 - Síntese de 2-etoxipirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (8)

Tabela 2.1 - Condições reacionais para redução de cetona do composto 7

	Temperatura (°C)	NaBH ₄ (eq)	H ⁺	Tempo reacional (h)	Produtos detetados
8A	0	2	-	6	2-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de <i>tert</i> butil
8B	Refluxo	4	-	3	<i>tert</i> -butil N-(4-hidroxibutil)carbamato (9)
8C	-10	6	HCl (2N)	6	Mistura complexa
8D	-10	6	HCl (2N)	6	Mistura complexa
8E	Refluxo	6	Amberlyst	2	2-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de <i>tert</i> butil
8F	-25	4	-	4	Produto 8 residual
8G	-25	12	-	5	Produto 8 residual

O mecanismo da reação (Fig 2.7) envolve o ataque de um hidreto, proveniente do borohidreto do sódio, ao grupo carbonilo formando uma nova ligação C-H. De seguida o oxigénio forma um complexo com o borano e os pares não partilhados do átomo de azoto provocam a eliminação do oxigénio formando-se um ião imínio e tornando o carbono suscetível ao ataque de etanol, formando-se o composto **8**.

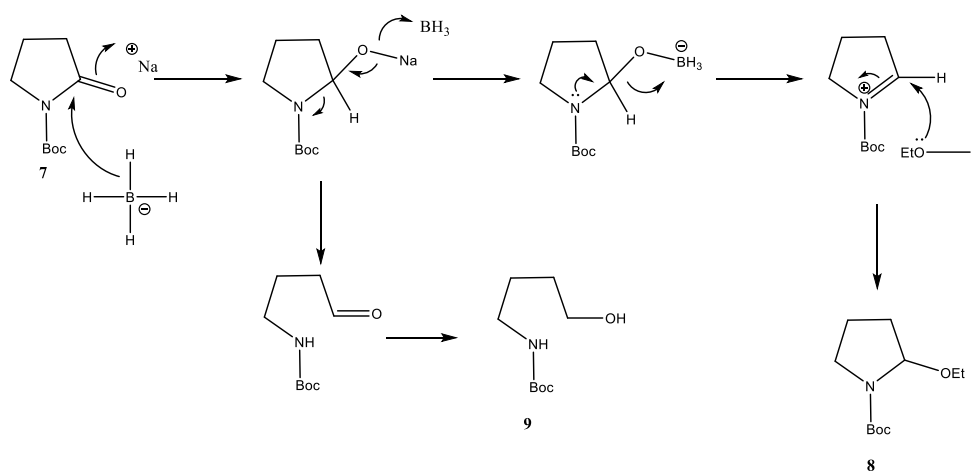


Figura 2.7 - Mecanismo proposto para redução do composto 7 ao composto 8.

Apesar das várias condições reacionais ensaiadas, o composto **8** apenas foi identificado e em quantidade residual em duas reações (entradas **8F** e **8G**, Tabela 2.1). Foi ainda identificado na reação (entrada **8B**) o *N*-(4-hidroxibutil)carbamato de *tert*-butilo (**9**). Dada a impossibilidade de obter **8** num rendimento aceitável esta via **A** foi abandonada. Também o facto de os compostos que aqui seriam obtidos se apresentarem como mistura racémica fez com que não fosse investido mais tempo na sua continuidade.

2.3 Metodologia adotada partindo da L-prolina

Na via **B** e **C** optou-se por usar como material de partida a L-prolina, tendo a vantagem de esta possuir a quiralidade necessária para a síntese do composto **1**. Ambas as vias apresentam a mesma estratégia sintética, mas enquanto na via **B** se iniciou por proteger a L-prolina com Boc, na via **C** iniciou-se com a introdução logo de início do grupo carbodiimida permitindo já a formação do grupo guanidina.

2.3.1 Reacções de derivatização da L-prolina

2.3.1.1 Protecção com *tert*-butil-carbonato

A primeira reação consistiu na protecção seletiva do átomo de azoto da L-prolina (Fig 2.8). Fez-se reagir a L-prolina com di-*tert*-butil-dicarbonato, em meio básico, usando uma mistura de 1,4-dioxano e água como solvente. Usou-se a ninidrina como reagente de revelação em c.c.f. em que se detetou a ausência do composto de partida.

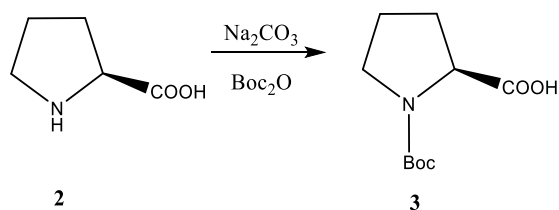


Figura 2.8 - Síntese de *N*-*tert*-butiloxycarbonil-*S*-prolina (3)

Após a reação, evaporou-se o solvente e a fase aquosa foi lavada com acetato de etilo de forma a remover dicarbonato que não tenha reagido. De seguida fez-se uma lavagem com uma solução ácida para reagir com o anião carboxilato de modo a que este

fosse extraído para a fase orgânica com acetato de etilo tendo-se obtido o *N*-*tert*-butiloxicarbonil-*S*-prolina (*N*-Boc-prolina, **3**) com um rendimento de 84%.

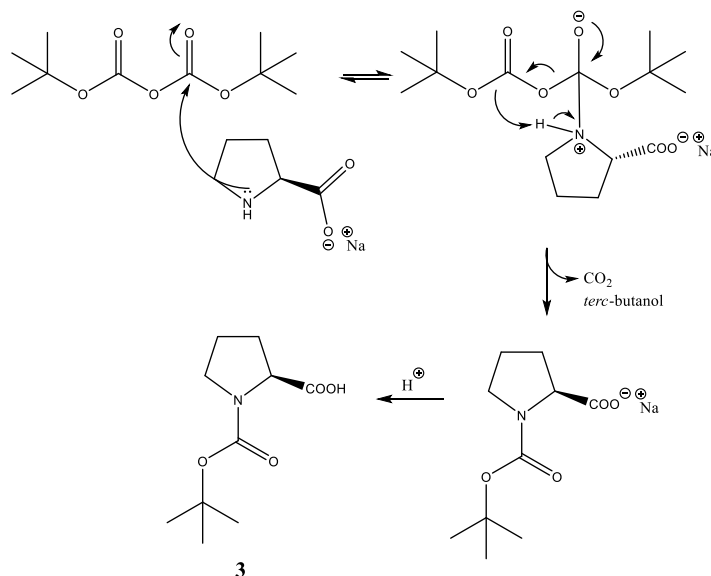


Figura 2.9 - Mecanismo proposto para proteção da L-Prolina com Boc_2O

O mecanismo reacional (Fig 2.9) envolve o ataque nucleófilo do azoto ao átomo do dicarbonato. A recuperação do carbonilo provoca a eliminação de dióxido de carbono e a formação de *tert*-butanol que funcionam como força motriz da reação. O *tert*-butanol é facilmente removido por evaporação a pressão reduzida, juntamente com o 1,4-dioxano.

O composto **3** foi confirmado por espectroscopia de IV e RMN (^1H e ^{13}C). No espectro de IV observa-se a presença de duas bandas fortes características do alongamento do grupo carbonilo para o ácido carboxílico a 1738 cm^{-1} e para o carbamato a 1638 cm^{-1} . A diferença de comprimento de onda das duas bandas é devido ao efeito indutivo eletroatrator do oxigénio adjacente ao ácido carboxílico, enquanto que no grupo carbamato este efeito é compensado pelo átomo de azoto. Nota-se, ainda, uma banda forte a 2977 cm^{-1} correspondente ao estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ da cadeia alifática, tal como uma banda larga $2500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ característica do grupo hidroxilo do ácido.

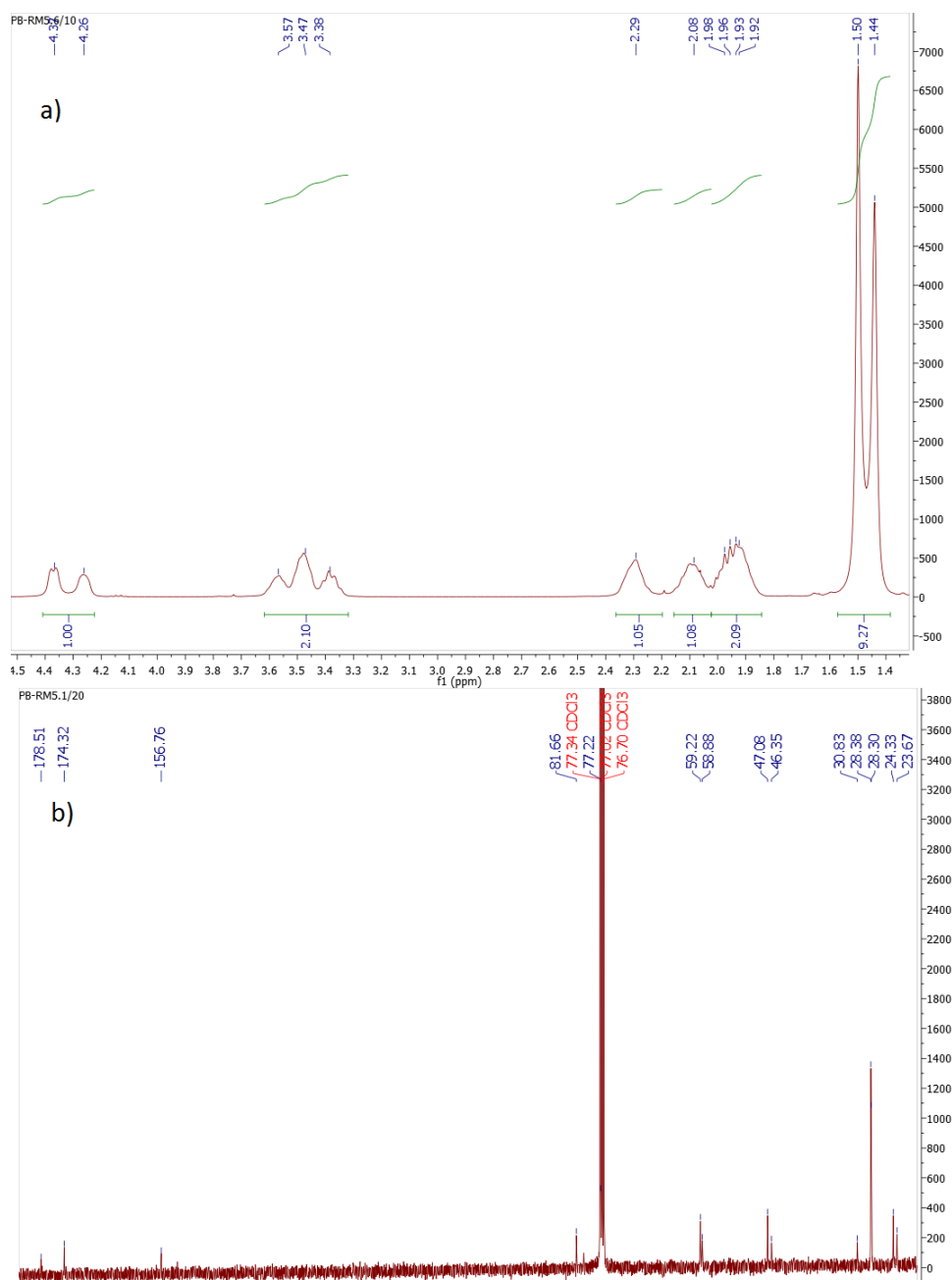


Figura 2.10 - Espectros de RMN (a) ¹H e b) ¹³C) do composto 3 em CDCl₃

A introdução do grupo Boc na L-prolina é confirmada no espectro de ¹H-RMN pela presença de sinais de prótons do grupo *terc*-butilo sob a forma de dois singletos a 1,50 e 1,44 ppm a integrar no total para 9 prótons (Fig 2.10). No espectro de ¹³C-RMN os respectivos átomos de carbono surgem a 28,38 e 28,30 ppm. Enquanto que o átomo de carbono quaternário do *terc*-butilo surge a 81,66 ppm e o átomo de carbono do carbonilo do Boc a 156,76 ppm. A 178,51 ppm encontra-se o sinal correspondente ao átomo de carbono do grupo carbonilo do grupo ácido. Tal como no composto 7, a presença de

rotâmeros é evidenciada no espectro de ^1H -RMN pelo aparecimento de multipletos largos do esqueleto heterocíclico assim como pelos dois singuletos dos grupos metilo do *terc*-butilo. Devido ao caráter rotacional da ligação do carbamato, representada na figura 2.11 que deve apresentar uma frequência de rotação baixa, e devido à possibilidade de formação de ligações por pontes de hidrogénio que fixam ainda mais estas estruturas, deteta-se o mesmo núcleo em dois ambientes químicos e magnéticos diferentes surgindo assim singuletos duplicados e sinais com multiplicidade indefinida, o que dificulta a atribuição, nos espectros de RMN. Este fenómeno é visível ao longo da caracterização dos compostos protegidos com o grupo Boc.

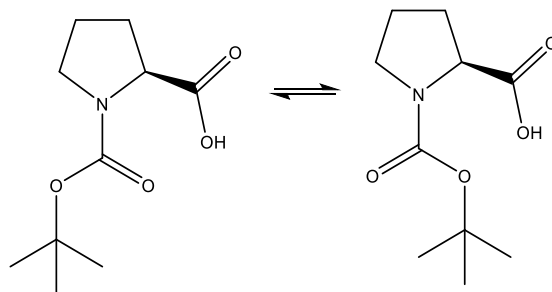


Figura 2.11 - Rotação intramolecular do composto 3

O espectro de GC-MS realizado ao composto não derivatizado apresenta um ião molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ fraco a m/z 216 u.m.a.. No entanto, o espectro de GC-MS realizado ao composto derivatizado com BSTFA identifica-se o ião molecular de intensidade baixa a m/z 287 assim como o ião fragmento intenso a m/z 216 tal como as fragmentações que se apresentam na figura seguinte (Fig 2.12) que comprovam a estrutura proposta.

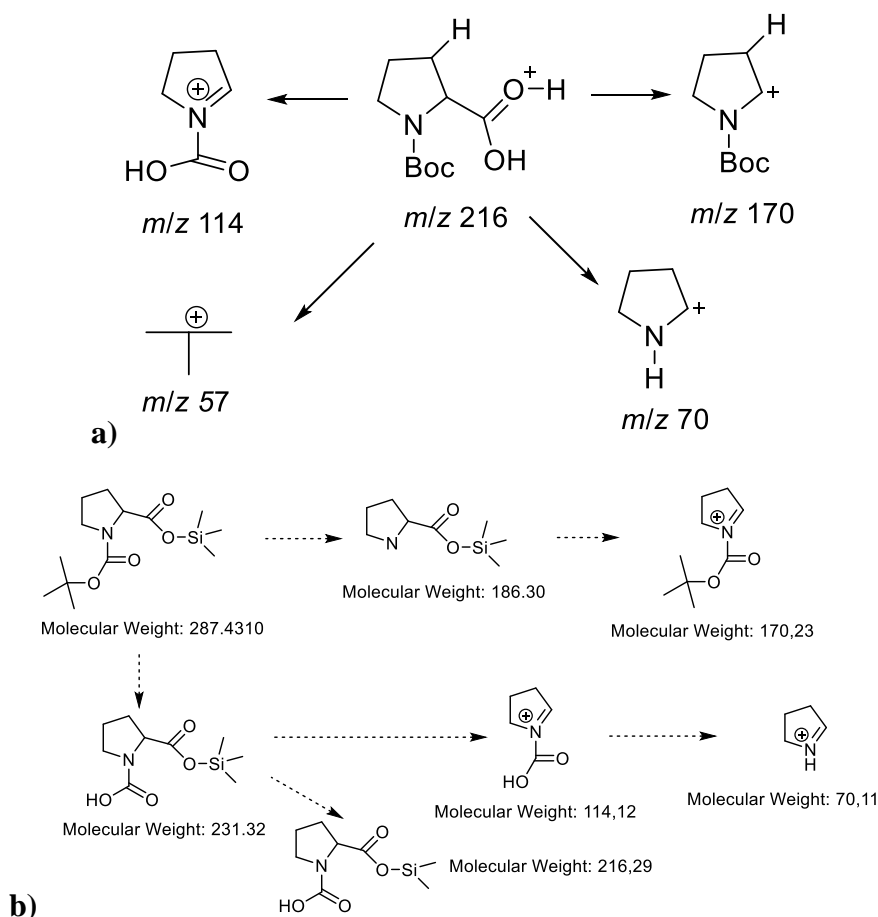


Figura 2.12 -Fragmentações propostas para os picos observados no espectro de GC-MS do composto 3 (a) e do composto 3 siliado com *N,O*-di(trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA) (b)

2.3.1.2 Inserção do grupo carbodiimida

Esta reação consistiu na proteção seletiva do átomo de azoto da L-prolina com um grupo *N*-Boc-carbodiimida. Fez-se reagir a L-prolina com 1,3-di-(*terc*-butiloxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (**10**), em meio básico, usando 1,4-dioxano e água como solvente (Fig 2.13). Usou-se a ninidrina como reagente de revelação em c.c.f em que se detetou a ausência do composto de partida.

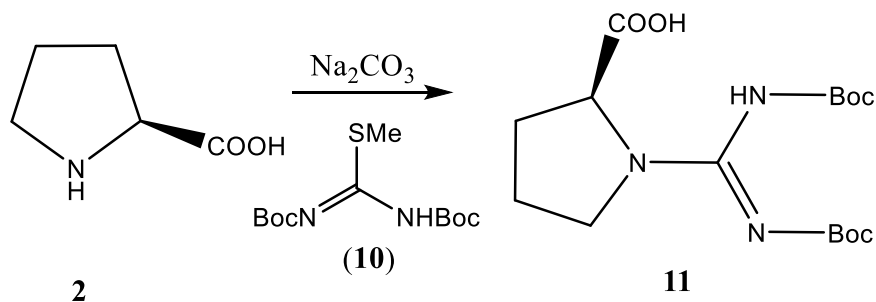


Figura 2.13 - Síntese de *N,N'*-di(*terc*-butiloxicarbonil)carbamimidoil-*S*-prolina (*N*-Boc-carbamoiil-*S*-prolina, **11**)

Após a reação, evaporou-se o solvente e a fase aquosa foi lavada com acetato de etilo de forma a remover algum composto **10** que não tenha reagido. De seguida fez-se uma lavagem com uma solução ácida para libertar o anião carboxilato e ao extrair-se com acetato de etilo obteve-se o *N,N'*-di(*tert*-butiloxicarbonil)carbamimidoil-S-prolina (*N*-Boc-carbamoil-prolina, **11**) com um rendimento de 61%. O mecanismo reacional (Fig 2.14) envolveu o ataque nucleófilo do azoto da L-prolina ao átomo de carbono central do composto **10** ocorrendo a deslocação de um par de eletrões para o átomo de azoto. A recuperação da ligação dupla provoca a eliminação de metanotiol gasoso operando como força motriz da reação e formando-se o *N*-Boc-carbamoil-prolina (**11**).

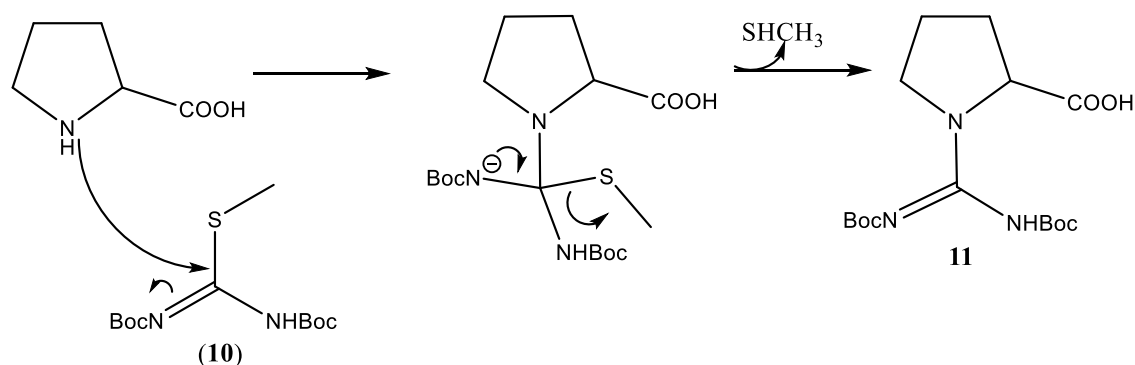


Figura 2.14 - Mecanismo proposto para inserção do grupo carbodiimida e formação de **11**.

O composto **11** foi confirmado por espectroscopia de RMN (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e DEPT, Fig 2.15). A introdução do grupo carbodiimida é evidenciada pelos sinais dos prótons do grupo *tert*-butilo sob a forma de dois singuletos a 1,36 e 1,31 ppm a integrar para 18 prótons no total. No espectro de ^{13}C -RMN os respetivos átomos de carbono surgem a 28 ppm. Enquanto que os átomos de carbono quaternários dos grupo *tert*-butilo surge a 82 ppm e os átomos de carbono dos grupos carbonilos do Boc a 153 ppm. O átomo de carbono da função ácido carboxílico surge a 171,65 ppm. O átomo de carbono central do grupo carbodiimida surge a 151,17 ppm.

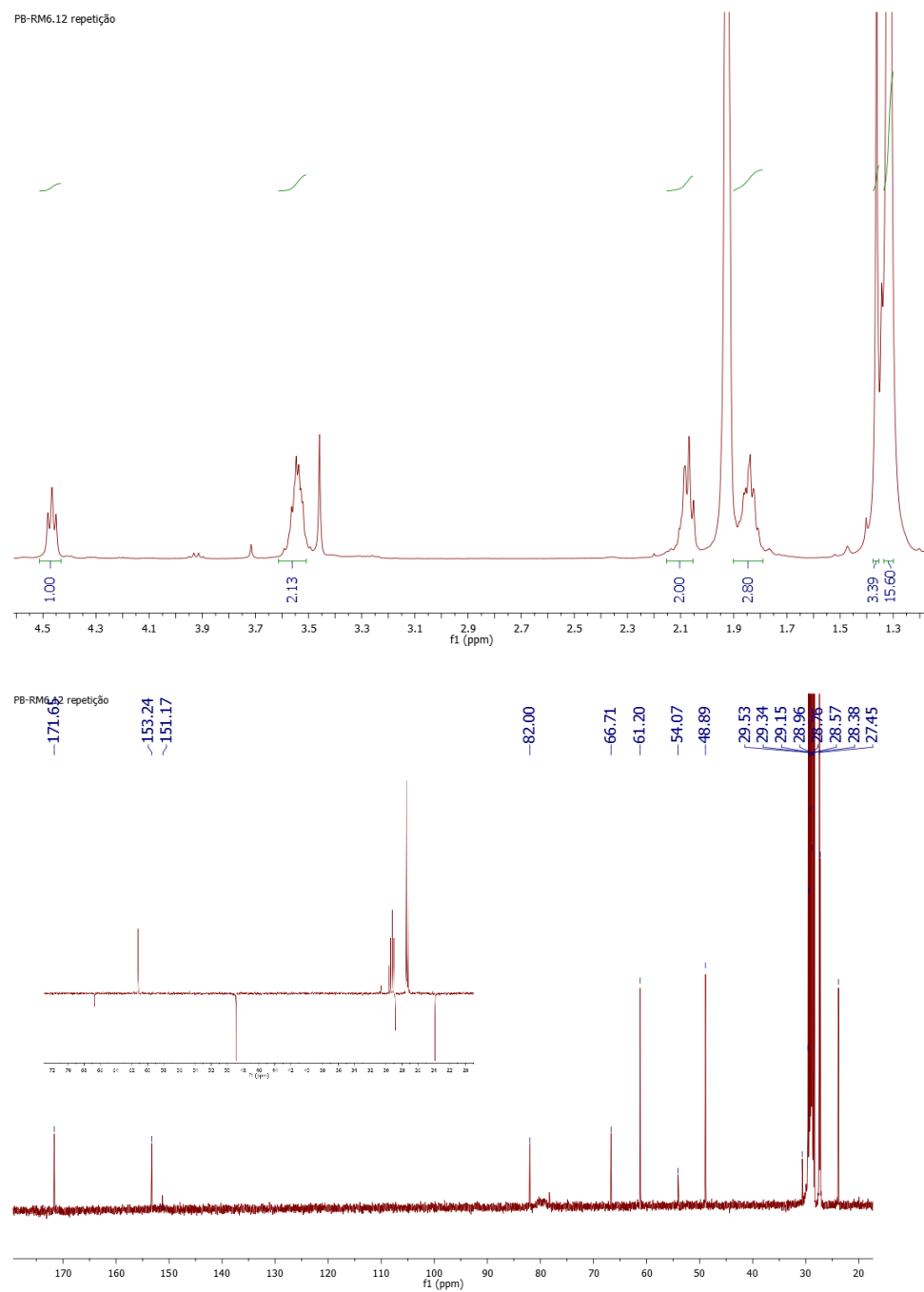


Figura 2.15 - Espectro a) ^1H -RMN b) ^{13}C em acetona- d_6 do composto 11 com o espectro de DEPT inserido

O espectro de ESI (Fig 2.16) indica que se está na presença do composto.

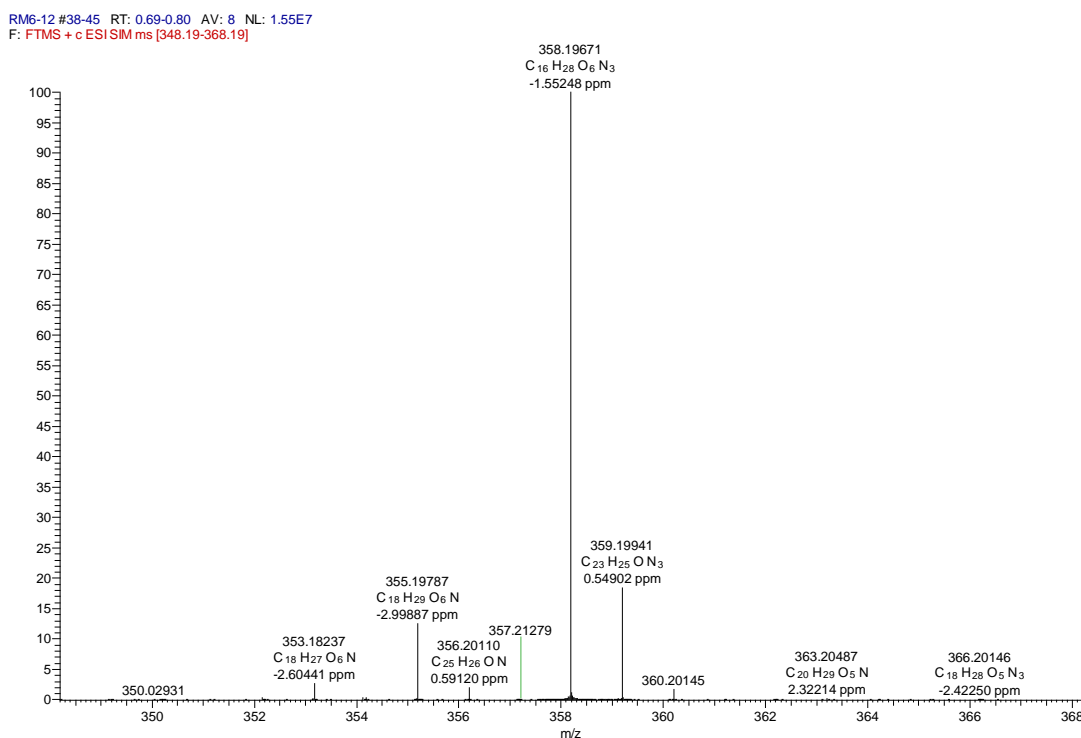
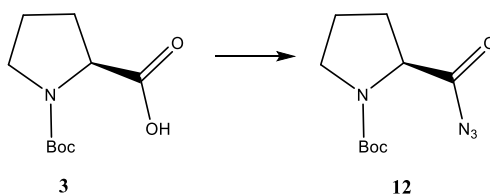


Figura 2.16 - Espectro de ESI do composto 11

2.4 Síntese de acil azidas

2.4.1 Partindo da Boc-prolina (3)

As acil azidas são derivados de ácidos carboxílicos em que o grupo hidroxilo é substituído por um grupo azida (N₃). Existem diferentes metodologias para conseguir esta transformação, mas é usualmente necessário ativar o ácido carboxílico de modo a torná-lo mais suscetível ao ataque do grupo azida. Esta ativação envolve a formação de éster de ácidos carboxílicos ou anidridos mistos (Fig 2.17).^{8,11}



Metodologias adotadas no presente trabalho:

- A. i) CH₂N₂, ii) NH₂NH₂·H₂O, iii) NaNO₂;
- B. i) cloroformiato de etilo/NEt₃, ii) NaN₃;
- C. i) NMM, cloroformiato de isobutilo, ii) KH₂PO₄, NaN₃

Figura 2.17 – Metodologias adotadas para a preparação de acil azidas.

2.4.1.1 Envolvendo a formação de éster de ácidos carboxílicos

A primeira reação consistiu na esterificação da *N*-Boc-prolina (**3**) recorrendo ao uso de diazometano e de seguida transformação numa acil hidrazina e oxidação com nitrito de sódio à acil azida. O mecanismo é apresentado na Fig 2.18.

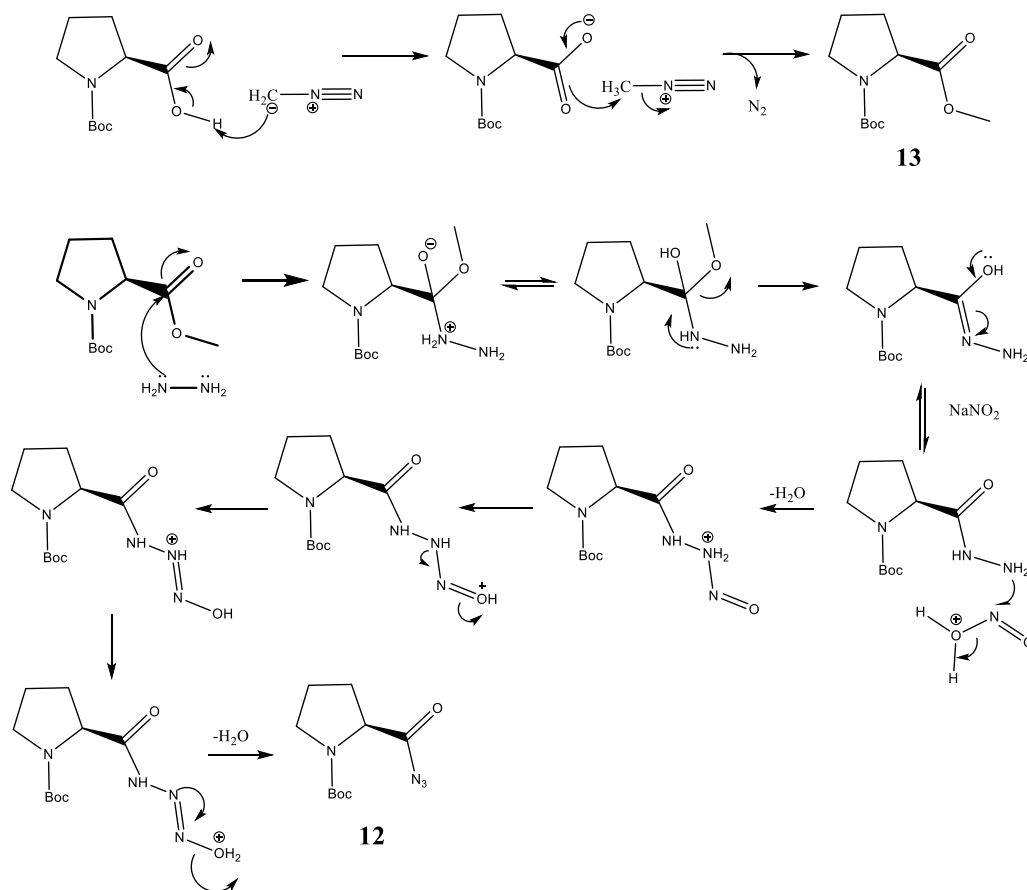


Figura 2.18 - Mecanismo proposto para a preparação de cil azidas envolvendo a formação de ésteres

A esterificação com diazometano do grupo ácido da *N*-Boc-prolina (**3**) foi efetuada em metanol e obteve-se a *S*-pirrolidina-1,2-dicarboxilato de 2-metil 1-*terc*-butilo (*N*-Boc-prolina metil éster, **13**) com um rendimento de 85% após evaporação a pressão reduzida do solvente.

O mecanismo tem como base a protonação do diazometano pelo ácido carboxílico, formando-se um carboxilato e tornando o diazometano num ótimo agente de alquilação devido ao grupo de N_2 ser um bom grupo de saída. O carboxilato de seguida ataca o grupo metilo e ocorre a libertação entrópica de azoto, formando-se o composto **13**.

O composto **13** foi confirmado por RMN (^1H e ^{13}C). No espectro de ^1H -RMN observa-se a presença dos prótons do grupo metilo a 3,70 ppm a integrar para 3 prótons e no espectro de ^{13}C -RMN o carbono correspondente a 51,88 ppm.

De seguida tentou-se formar a acil azida (**12**) a partir do composto **13** adicionando hidrato de hidrazina em etanol, seguido de acidificação da reação com uma mistura de $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (10:1) e posterior adição de uma solução de nitrito de sódio, segundo o procedimento descrito na literatura²⁵. O mecanismo é apresentado na Fig 2.18.

O mecanismo reacional consiste no ataque da hidrazina ao grupo carbonilo da função éster e após a recuperação do carbonilo forma-se a acil hidrazina. De seguida, o meio reacional é acidificado e adiciona-se nitrito de sódio. Transferências sucessivas de próton e eliminação de água permite obter o composto **12**.

O composto **12** não foi detetado por espectroscopia de IV nem por RMN. No espectro de IV não se verifica a presença da banda característica de acil azida a 2138 cm^{-1} . As bandas no IV são idênticas às observadas para o composto **13**. Também no espectro de ^1H -RMN se identificam todos os sinais pertencentes à L-prolina protegida com Boc e ainda o sinal dos prótons do grupo metilo a 3,74 ppm, a integrar para 3 prótons comprovando o facto de a reação não ter ocorrido com sucesso.

2.4.1.2 Envolvendo a formação de anidridos mistos

Estes processos envolvendo a formação de um anidrido misto envolvem uma reação *one pot* em que após a formação do anidrido misto há reação com a azida de sódio. Numa primeira abordagem usou-se o cloro formiato de etilo para a formação do anidrido misto, na presença de trietilamina como base^{11,26} e numa segunda aproximação usou-se como reagente acilante o cloro formiato de isobutilo e *N*-metilmorfolina (NMM) como base.^{12,13} Na Fig 2.19 é apresentado o mecanismo geral, independentemente da base ou do cloro formiato usado.

Quando se recorre ao cloro formiato de etilo/ NEt_3 , a acil azida **12** foi obtida com um rendimento de 69% após *work-up*.

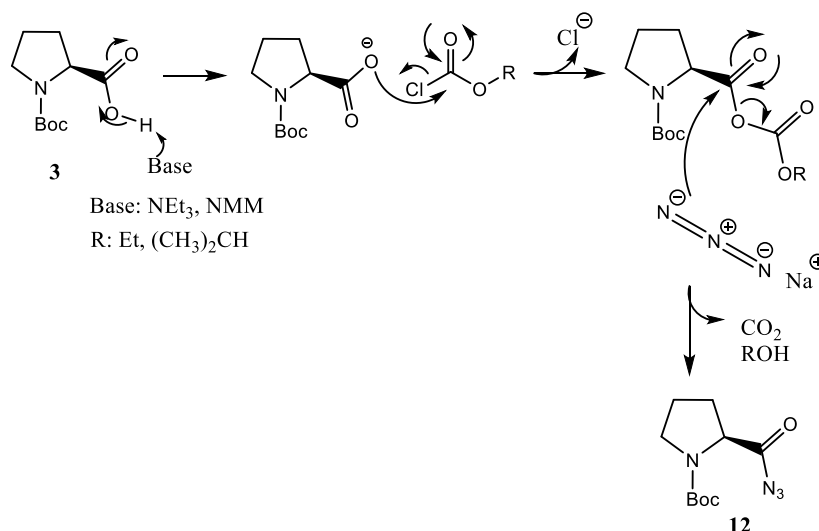


Figura 2.19 - Mecanismo proposto para a formação da acil azida (**12**) envolvendo o anidrido misto

O mecanismo reacional envolve a desprotonação do ácido carboxílico da L-prolina por meio da base. O carboxilato de seguida ataca o carbonilo do cloro formiato de alquilo e devido à recuperação da ligação $\text{C}=\text{O}$ ocorre a saída do ião cloreto e a formação do anidrido misto. Aquando da adição da azida de sódio, esta ataca o carbonilo mais eletrofílico dando-se a libertação de dióxido de carbono e o álcool respetivo com a formação do composto **12**. Noutra abordagem optimizou-se as condições reacionais usando-se *N*-metil-morfolina (NMM) ao invés de NEt_3 e cloro formiato de isobutilo ao invés de cloro formiato de etilo, e ainda usando um meio de fosfato de monopotássio (KH_2PO_4), tendo-se obtido o composto **12** com um rendimento de 89%.^{12,13} O uso de cloro formiato de isobutilo detêm maior impedimento estereoquímico no carbono carbonilo menos eletrofílico, em oposição ao cloro formiato de etilo, e por tal o ataque ao carbono adjacente à L-prolina é, neste caso, preferencial. A única desvantagem do uso de cloro formiato de isobutilo é a formação de isobutanol, uma vez que apresenta um ponto de ebulição mais elevado do que o etanol. A presença de KH_2PO_4 aquando da adição da azida de sódio mantém o pH reacional a 7 ao neutralizar o ião hidróxido proveniente da hidrólise da azida de sódio.¹²

O composto **12** foi caracterizado por espectroscopia de IV e RMN. No espectro de infravermelho confirma-se a formação da acil azida por a banda característica a 2138 cm^{-1} , observa-se também a presença de duas bandas fortes características do alongamento do

grupo carbonilo para a acil azida a 1696 cm^{-1} e para o carbamato a 1647 cm^{-1} . A 2977 e 2875 cm^{-1} bandas correspondentes ao alongamento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ em cadeias alifáticas e a 3434 cm^{-1} observa-se uma banda forte indicativa da presença de material de partida e/ou água. Ao analisar o espectro de ^1H -RMN observa-se os sinais característicos dos prótons da L-prolina analisados anteriormente (Fig 2.20). Observou-se que a acil azida é instável à temperatura ambiente. Verificou-se por RMN que com o tempo, o sinal correspondente ao próton da posição 2 vai diminuindo com o tempo e começa a surgir um multipletto a aproximadamente $5,5\text{ ppm}$.

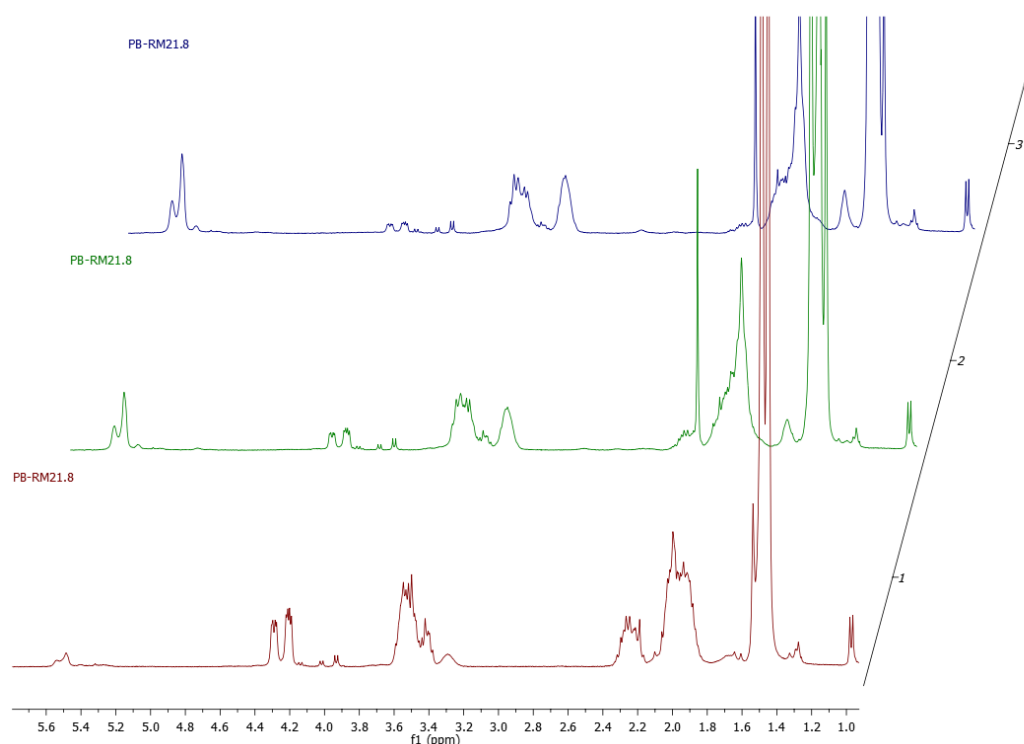


Figura 2.20 – Espectros de ^1H -RMN de **12** em CDCl_3 (1-efetuado após 10 min, 2-efetuado após 4h, 3-efetuado após cerca de 24h)

Quando se tentou realizar o espectro de GC-MS desta amostra, a mesma apresenta o cromatograma que se encontra na Fig 2.21 onde se identificam os picos a 9,23 min, 10,33 min e 12,16 min. Este comportamento está de acordo com a instabilidade deste composto que foi observado no estudo por RMN por Meatherall e Palatnick²⁷. No estudo para detetar azidas no plasma do sangue derivatizaram-as com o anidrido propriónico à acil azida correspondente as quais são instáveis e decompõem-se no injetor do cromatógrafo dando origem aos correspondentes isocianatos. Quando esta amostra foi sujeita a aquecimento na presença de água durante 30 minutos o GC-MS mostrou praticamente o desaparecimento do pico a 9,23 min e o aumento do pico a 12,16 min (Fig

2.21 a)). Apesar da dificuldade na detecção dos iões moleculares propomos em função destes resultados a atribuição apresentada na Fig 2.23 O procedimento adotado por Verardo et al ¹² recorrendo a NMM e cloroformiato de isobutilo foi reproduzido neste estudo. A reação foi seguida pelo aparecimento da banda a 2138 cm^{-1} e assim que se começava a detetar a presença da banda a aproximadamente 2240 cm^{-1} correspondente ao isocianato a reação era dada por terminada. Apesar de os autores reportarem o isolamento do isocianato pensa-se que este resultado foi erradamente reportado porque:

- A presença de duas bandas no IV a 2246 e 2139 cm^{-1} que os autores referem são identificativas da presença das duas estruturas, a acil azida e o isocianato.
- Quer os resultados de espectrometria de massa quer os da análise elementar podem ter sido o resultado da transformação rápida da acil azida ao isocianato tal como apresentado na Fig 2.22.
- Uma simulação do espectro de ^1H -RMN com o programa Mestre Nova indica para o sinal do protão da posição C-2 o valor de $5,23\text{ ppm}$, o que parece apresentar uma boa concordância com o sinal que observámos a surgir com o tempo a aproximadamente $5,5\text{ ppm}$ (Fig 2.20)

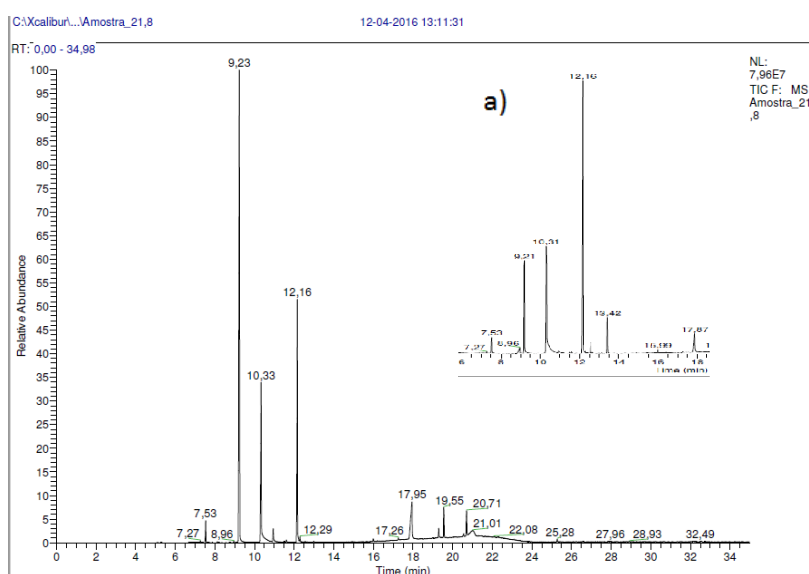


Figura 2.21 - GC-MS da acil azida (**12**) e a) após aquecimento da reação em água.

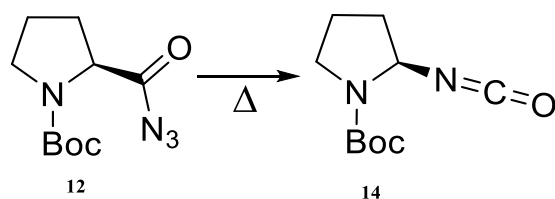


Figura 2.22 - Transformação da acil azida no correspondente isocianato. Preparação de de terc-butil-1-carboxilato 2-S-isocianato de pirrolidina (**14**)

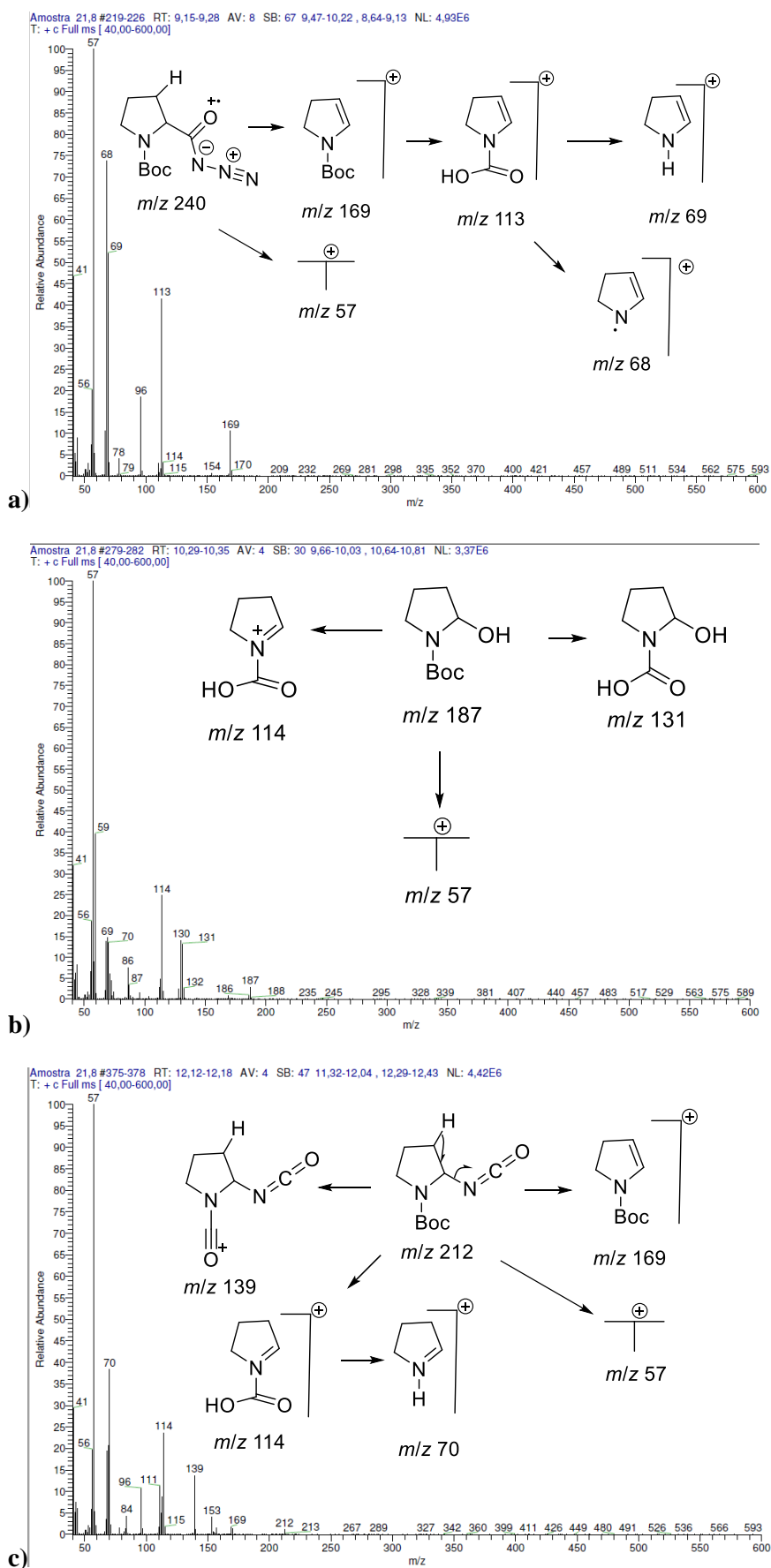


Figura 2.23 - Fragmentações propostas para os picos observados no GC-MS da Fig 2.21.

2.5 Síntese de Isocianatos por Rearranjo de Curtius

Para a síntese de isocianatos, partiu-se de **12** e recorreu-se ao rearranjo de Curtius ao fornecer calor a acil azidas, provocando a sua decomposição e libertação de azoto gasoso (Fig 2.22). O mecanismo da reação é apresentado na Fig 2.24.

Para a formação de isocianatos dissolveu-se as acil azidas em solventes secos (diclorometano, tetrahydrofurano ou tolueno) e usou-se diferentes temperaturas (45 °C, 50-60 °C e 65 °C), tal como diferentes tempos reacionais (entre 10 min a 4 h). Devido às bandas características tanto de acil azidas, como de isocianatos, em espectroscopia de IV, seguiu-se as reações observando o desaparecimento da banda a 2138 cm⁻¹ (acil azida) e a formação da banda a 2246 cm⁻¹ (isocianato).^{12,25}

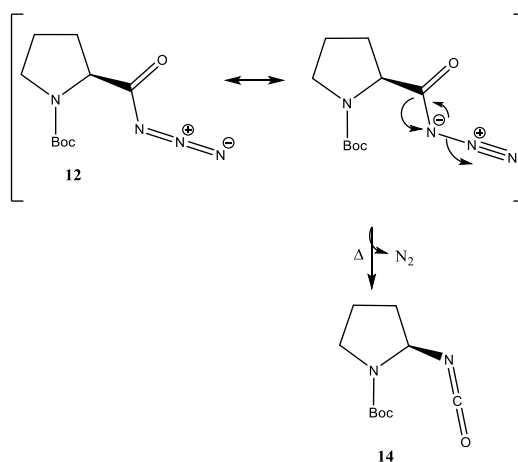


Figura 2.24 - Mecanismo proposto para formação de **14**

O mecanismo reacional para a formação de isocianatos, usado ao longo do trabalho, teve como base a decomposição térmica de acil azidas, designado por rearranjo de Curtius. Devido à suscetibilidade do isocianato a ataques nucleofílicos, teve-se de ter em atenção em manter a reação em condições inertes e o uso de solventes sem a presença de álcool.

Inicialmente, ao seguir a reação por IV, tendeu-se a aguardar que a banda correspondente à acil azida diminuísse a sua intensidade (2138 cm⁻¹) e a banda de isocianato (2246 cm⁻¹) formasse-se ao longo do tempo (Fig 2.25). Após a evaporação do solvente obteve-se o composto **14** com um rendimento de 30% e por RMN (Fig 2.26), verificou-se uma estrutura idêntica ao composto **12** exceto para o protão da posição 2.

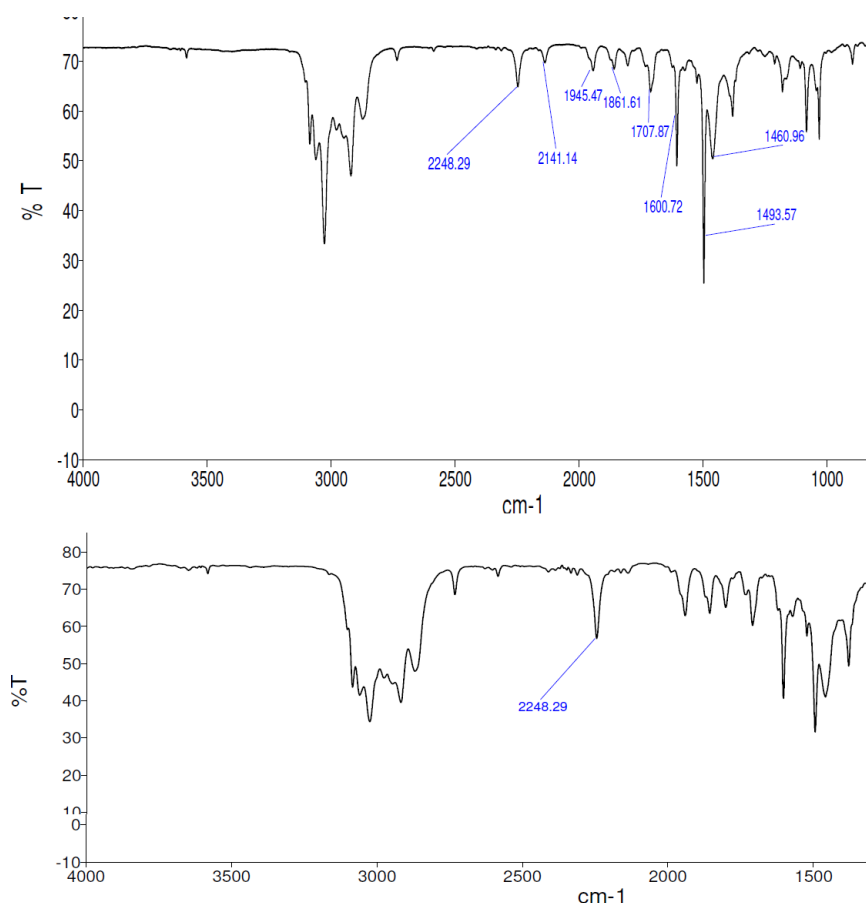


Figura 2.27 - Espectros de IV para formação de isocianato ao longo de 30 min (Tolueno – 65° C)

2.6 Conversão de *N*-Boc-carbamoil-prolina (**11**) na acil azida (**15**).

De uma forma análoga à síntese do composto **12** (usando o método C), fez-se uma conversão do grupo ácido carboxílico de *N*-Boc-carbamoil-prolina (**11**) na acil azida correspondente que doravante se designará por *N*-Boc-carbamoil-2-(azidocarbonil)prolina (**15**) (Fig 2.28).

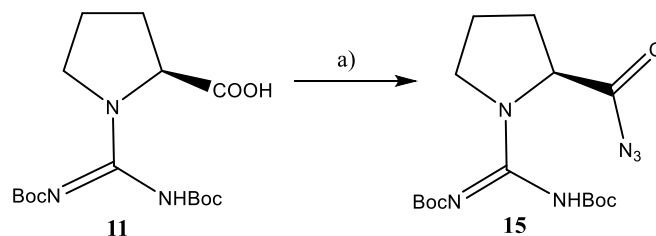


Figura 2.28 - Síntese de *N*-Boc-carbamoil-2-(azidocarbonil)prolina (**15**) a) NMM, cloroformiato de isobutilo, depois KH₂PO₄ e azida de sódio.

O composto **15** foi obtido com um rendimento de 36% e caracterizado por IV e ^1H -RMN. No espectro de IV confirma-se a formação da acil azida pela banda característica a 2141 cm^{-1} , e o respetivo carbonilo a 1763 cm^{-1} , tal como uma banda forte a 1647 cm^{-1} correspondente aos carbonilos dos grupos Boc. A banda intensa a 3417 cm^{-1} deve-se provavelmente à presença de isobutanol formado durante a reação. No espectro de ^1H -RMN confirma-se a estrutura **15** através dos sinais respetivos dos grupos Boc a 1,60-1,49 ppm e os prótons da L-prolina a campo alto. Para a acil azida identifica-se o multiplete do próton H-2 a 4,19-4,22 ppm.

2.7 Reação de isocianatos com nucleófilos

O isocianato é um grupo funcional bastante reativo perante vários nucleófilos de carbono¹⁰, de azoto²⁸ e de oxigénio²⁹. A reação do isocianato de L-prolina, com outros grupos protetores para além do Boc no átomo de azoto, encontra-se descrita na literatura.²⁹

2.7.1 Reação com alcóois – formação de carbamatos

Neste caso, para a formação do composto **16** fez-se a adição do álcool cinâmico ao isocianato na presença de uma base forte, NaH (Fig 2.29).

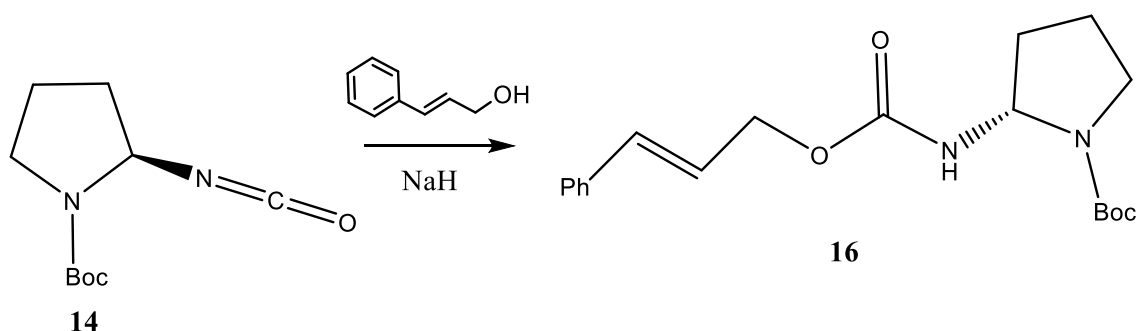


Figura 2.29 – Previsível reação entre o isocianato (**14**) e o álcool cinâmico com vista à obtenção de *terc*-butil-1-carboxilato 2-*S*-((amino)carbonil)cinamiloxi)pirrolidina (**16**)

Após se ter verificado o consumo do isocianato por IV, evaporou-se o solvente e purificou-se o composto por coluna cromatográfica seguido de uma placa preparativa.

O mecanismo reacional envolve o uso de NaH de forma a desprotonar o álcool cinâmico, ocorrendo a libertação de H₂, tornando-o mais nucleófilo. Ao adicionar o composto **14** à solução, esperar-se-ia que o alcóxido ataca-se o carbono do grupo isocianato com formação do composto **16**. Após análise dos dados de IV, RMN e EM pensa-se que não se chegou a obter o produto desejado. Esta foi uma reação realizada quando ainda não estavam otimizadas as condições reacionais para a obtenção do isocianato e deste modo não se pode garantir que se estaria na presença do isocianato **14**.

2.7.2 Reação com nucleófilos de carbono – formação de amidas

Um outro processo para a formação da ligação amida envolve a adição de reagentes de Grignard a isocianato. Este processo é mais vantajoso uma vez que não implica a passagem do grupo funcional isocianato a amina (como será abordado no capítulo seguinte). O procedimento adotado envolveu, após a formação do isocianato (20-30 min, em tolueno a 65 °C²⁸, a adição do reagente de Grignard (brometo de fenil magnésio). (Fig 2.30). Seguiu-se a reação por c.c.f e recorrendo ao reagente de Dragendorff e KMnO₄ e verificou-se a formação de uma nova mancha.

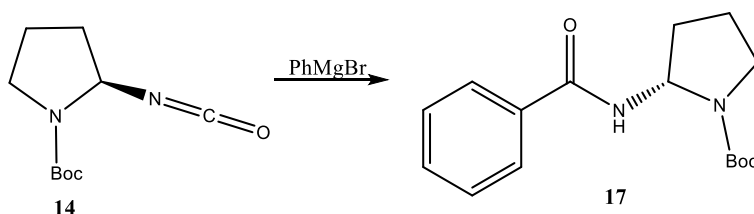


Figura 2.30 - Síntese *tert*-butil 1-carboxilato-2-benzamidopirrolidina (**17**)

Após a adição de água, de forma a fazer o *quenching* de reagente de Grignard que não tenha reagido e protonar as espécies aniônicas presentes, evaporou-se o solvente orgânico e extraiu-se o composto para clorofórmio, procedeu-se a uma purificação em coluna cromatográfica flash, tendo-se obtido o composto **17** com um rendimento de 45%.

O composto **17**, foi caracterizado por IV e ¹H-RMN. Por espectroscopia de IV, as bandas mais distintas que são características deste composto são a 3058 cm⁻¹ relativas a ligações C_{sp2}-H, tal como a 1400 cm⁻¹ (C=C aromática), a 1679 cm⁻¹ observa-se a banda relativa

aos grupos carbonilos, amida e carbamato. Por ^1H -RMN, os prótons presentes a campo alto, relativos à estrutura da L-prolina, encontram-se com uma integração ligeiramente superior ao esperado. Para isto poderão ter contribuído algumas impurezas no meio. A campo baixo encontram-se dois dupletos correspondentes aos prótons das posições *orto* apresentando uma constante de acoplamento de 8 Hz. Estes dois conjuntos de dupletos na proporção de 88:12 poderão ser devido a dois rotâmeros em torno da ligação amida. Entre 7,47 e 7,35 ppm surge um multipletto integrando para 3 prótons que correspondem aos restantes prótons do anel aromático. Os rotâmeros são também patentes pelo alargamento dos multipletos no ^1H -RMN e duplicação de sinais no ^{13}C -RMN. A estrutura foi confirmada por espectros bidimensionais COSY onde se observa a correlação entre o sinal H-2 a 5,35 ppm e o sinal multipletto H-3 presente a 1,7-2,0 ppm, tal como a correlação entre o sinal H-3 e o sinal multipletto a 3,1-3,5 ppm correspondente a H-4 (Fig. 2.31). O espectro de ESI-MS identificou o ião molecular a m/z 291,16986 correspondente a $[\text{MH}]^+$ (com um desvio de 1,5 ppm).

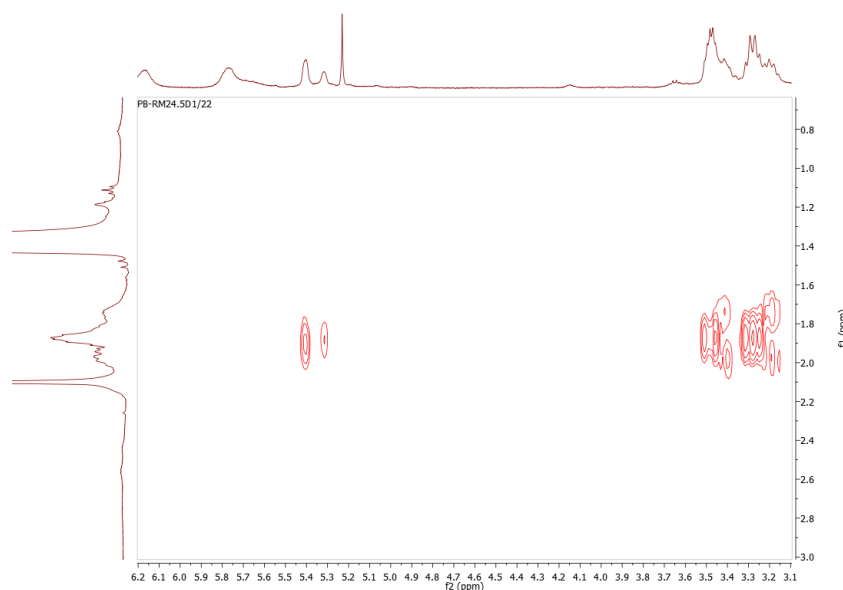


Figura 2.31 – Expansão de espectro COSY do composto **17** em CDCl_3

Usando o mesmo processo descrito anteriormente, usou-se o reagente de Grignard preparado a partir de bromo estireno⁹ (vide secção 2.12) para a formação do composto **18**, o qual se obteve com um rendimento de 7% após purificação por coluna cromatográfica flash (Fig 2.32). A concentração do reagente de Grignard foi calculada

recorrendo-se ao procedimento da literatura³⁰ no entanto, o baixo rendimento obtido na formação de **18** pode estar relacionado com um cálculo errado do título ou a alguma instabilidade associada ao reagente de Grignard.

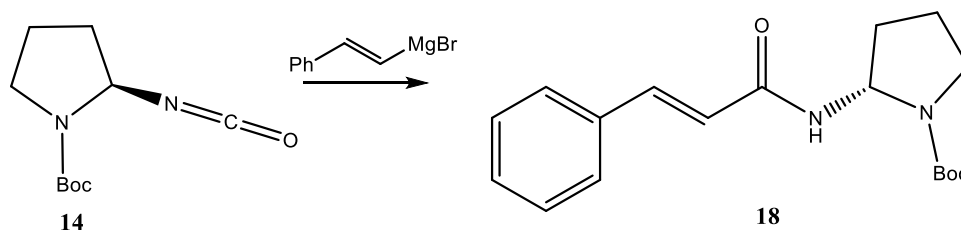


Figura 2.32 - Síntese terc-butil 1-carboxilato-2-cinamamidopirrolidina (**18**)

O composto **18** foi caracterizado por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, e confirmado recorrendo a COSY, HSQC e HMBC. A introdução do estireno e formação da ligação amida é confirmada devido aos sinais dos prótons relativos à ligação dupla que surge como dois dupletos a 7,54 ppm e 6,34 ppm em ^1H -RMN, com constante de acoplamento de 16 Hz indicativo de uma estrutura *trans*, e com os respetivos carbonos apresentando desvios a 141 ppm e 120 ppm em ^{13}C -RMN, respetivamente. Os sinais dos prótons *orto* do anel aromático surgem como um duplete a 7,41 ppm com integração de 2 e a 7,26 ppm um multiplete com integração de 3 prótons. A presença do sinal a 167 ppm no espectro de carbono indica o carbono carbonilo da ligação amida. Ao contrário das estruturas resultantes de condensações anteriores, os sinais de prótons correspondentes à L-prolina apresentam a integração e o desvio químico esperado, que foi possível confirmar a partir HSQC. Também por ESI-MS identificou-se o ião molecular a m/z 317,18517 correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.8 Formação da ligação amida por reação de condensação com derivados de ácidos carboxílicos

Para a formação da ligação amida com recurso a uso de reagentes de acoplamento (DCC e CDI) foi necessário uma hidrólise prévia do isocianato à correspondente amina (**19**), no qual se recorreu a uma solução básica de hidróxido de potássio (1%) para obtenção da amina (Fig 2.33). Após o *work-up*, que envolveu a separação de fases, em que se desprezou a fase aquosa e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, a solução contendo **19** foi adicionado a uma mistura de ácido 3-hidroxi-4-metoxi cinâmico

na presença de um reagente de acoplamento, CDI ou DCC. O composto **20** foi obtido com um rendimento de 2% aquando do uso de DCC. Não se pode aqui excluir que tenha havido reação entre duas moléculas de ácido carboxílico devido à presença do grupo fenol.

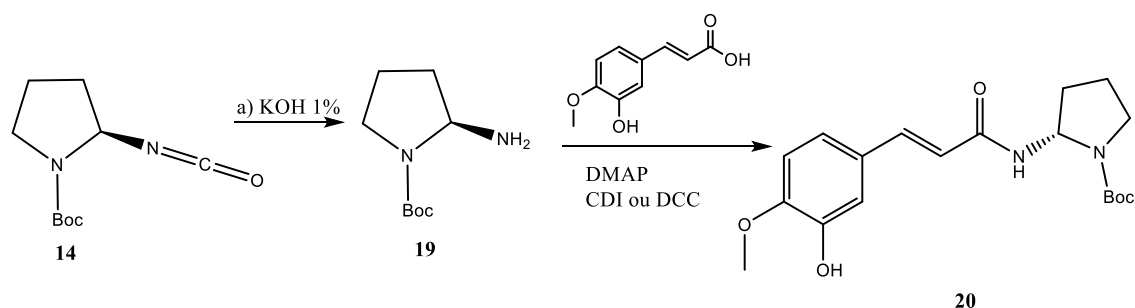


Figura 2.33 - Síntese de *terc*-butil 1-carboxilato-(*E*)-2(3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilamida)pirrolidina (**20**) precursor da Cernumidina.

Mecanicamente, o CDI e o DCC têm a mesma função, ativando o ácido carboxílico e tornando-o mais suscetível ao ataque nucleófilo do grupo amina. Em ambos os casos, após a formação do produto, o solvente foi evaporado e seguiu-se para purificação em coluna cromatográfica.

O composto **20** foi caracterizado por ^1H -RMN em que no caso do uso de CDI, mesmo após purificação, apresenta um espectro complexo não indicativo da formação do produto desejado. No caso do uso de DCC, confirma-se a inserção do derivado de ácido cinâmico devido aos prótons do grupo metilo na posição *para* do anel a 3,86 ppm, com um valor de integração 3. Os prótons da ligação dupla *trans*, com uma constante de acoplamento de 16 Hz, a 7,66 ppm, para o próton mais desblindado e a 6,63 ppm para o próton mais blindado. Contudo a amostra não se encontra totalmente pura, o qual se pode verificar a partir da integração dos prótons correspondentes à parte da L-prolina protegida com Boc, o que leva a crer que existam derivados do material de partida presentes.

Numa outra abordagem para se obter o composto **20a**, o composto **19** foi sujeito a uma adição de cloreto de ácido 4-metoxi cinâmico e trietilamina (Fig 2.34).

O *work-up* foi idêntico ao anterior, e neste caso obteve-se o composto **20a** com um rendimento de 21%. Na literatura encontra-se descrito que um análogo do composto **19** (Proteção com etilo ao invés de *terc*-butilo) é instável.¹⁷ Este fato pode estar na origem do baixo rendimento obtido.

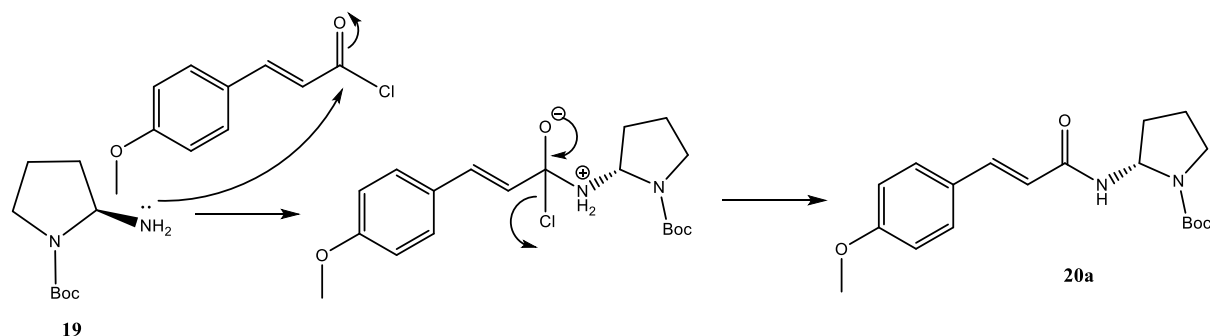


Figura 2.34 – Mecanismo proposto para a formação do composto **20a**

O mecanismo para a formação do composto **20a** envolveu um ataque nucleófilo ao carbono eletrofílico do cloreto de ácido, seguido da recuperação do grupo carbonilo que provoca a libertação do ião cloro, e a formação do produto. A trietilamina é usada de forma a armadilhar o HCl formado na reação.

O composto **20a** foi caracterizado por ^1H -RMN. Também aqui a amostra não se encontra pura, o que foi verificado a partir da integração mais elevada do que o esperado relativamente aos prótons a campo mais alto provenientes da L-prolina. Apesar de no espectro de massa de alta resolução se ter identificado o ião molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 347, correspondente ao composto **20a**, o pico principal corresponde a m/z 399 poderá ter origem na formação do derivado da ureia (**21**), representado na figura 2.35.

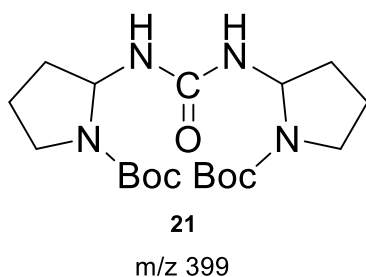


Figura 2.35 - di-*tert*-butil 2,2'-carbonil bis(azonediil))bis(pirrolidina-1-carboxilato) (**21**)

Para a preparação do composto **17** usou-se o procedimento idêntico ao anterior, mas com o recurso ao cloreto de benzoilo como agente acilante. Os dados espectroscópicos são idênticos ao composto obtido na reação entre o isocianato e o brometo de fenil magnésio (Fig 2.30). Mas neste caso obteve-se um rendimento de 13% em comparação ao procedimento anterior no qual se obteve um rendimento de 45%. As razões apontadas anteriormente para o baixo rendimento para a formação de **20** e **20a** poderão ter também

estado na origem do mais baixo rendimento na formação de **17** segundo este procedimento.

2.9 Reacções de *N*-Boc-carbamoil-2-(azidocarbonil)prolina (**15**)

2.9.1 Conversão in situ à amina e reação com cloreto de benzoílo

Para a formação do composto **22**, colocou-se o composto **15** em tolueno e adicionou-se cloreto de benzoílo na presença de trietilamina (Fig. 2.36). Seguiu-se a reação por c.c.f recorrendo ao uso do agente de revelação Dragendorff.

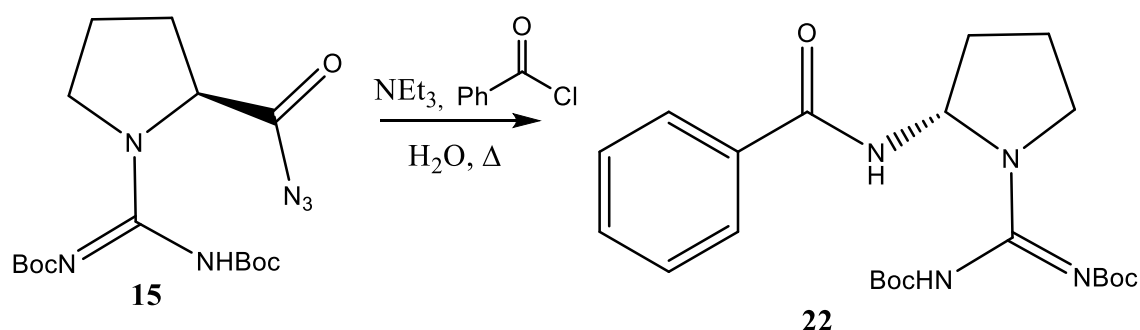


Figura 2.36 - Síntese de *N'*-benzil-*N*-Boc-carbamoil-prolina (**22**).

Após a adição de algumas gotas de água e colocar a reação sob refluxo durante 10 min a 65° C verificou-se a formação de uma nova mancha e procedeu-se à evaporação do solvente, seguido da adição de água e extração com clorofórmio. Após evaporação da fase orgânica, procedeu-se á purificação por c.c.f. tendo-se obtido um composto que apresenta uma integração muito elevada para a zona a campo alto em comparação com a zona aromática a campo baixo.

Uma outra forma para a obtenção do composto **22**, seria proceder à remoção do grupo Boc do composto **17**, e posterior inserção do grupo carbodiimida como se verá de seguida.

2.10 Reação de desproteção – remoção do grupo Boc

A partir do composto **17**, fez-se a desproteção do átomo de azoto proveniente da L-prolina usando condições ácidas (5 eq de TFA) em banho de gelo (Fig 2.37).

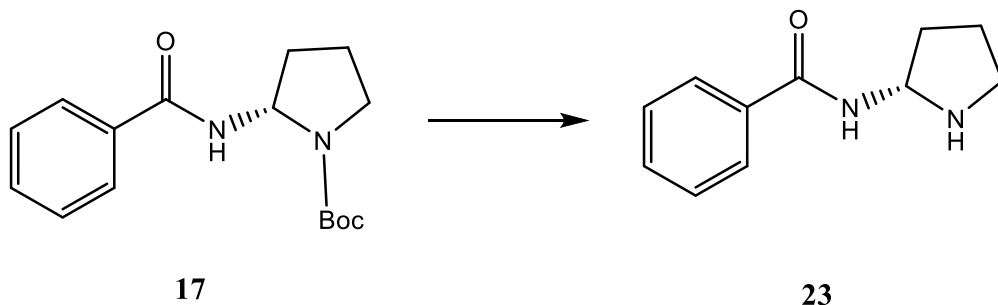


Figura 2.37 - Síntese de 2-benzamidopirrolidina (**23**)

O composto **23** foi caracterizado por IV e ^1H -RMN. No espectro de IV, salienta-se as bandas a 2970 e 2867 cm^{-1} características de ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, e apenas uma banda relativa a carbonilo 1651 cm^{-1} da ligação amida, e uma banda forte a 3440 cm^{-1} característica de um grupo álcool, provavelmente proveniente de *tert*-butanol que não tenha sido removido na sua totalidade. Por ^1H -RMN confirma-se os sinais de próton característicos da parte aromática e os sinais da estrutura da L-prolina. Nota-se um sinal a $1,45\text{ ppm}$, mas que pensa-se que tal seja devido à presença de *tert*-butanol, também confirmado por IV.

2.11 Reação de inserção do grupo carbodiimida no composto **23**

De uma forma análoga à inserção do grupo carbodiimida no composto **2**, a proteção seletiva do átomo de azoto do composto **23** com um grupo *N*-Boc-carbodiimida foi efetuada em meio básico, usando 1,4-dioxano e água como solvente. (Fig. 2.38). Usou-se Dragendorff como reagente de revelação em c.c.f em que se observou o consumo do composto de partida.

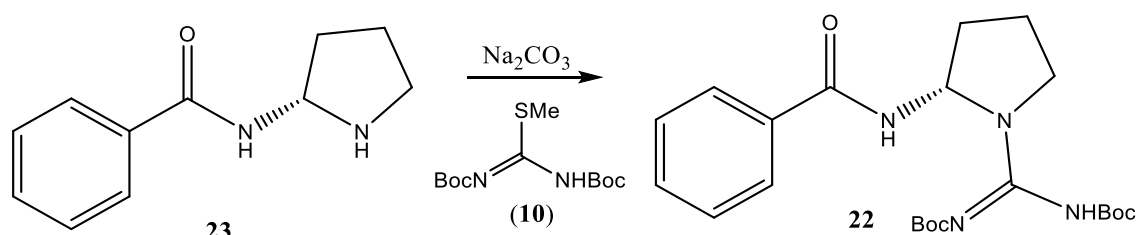


Figura 2.38 - Síntese do composto **22** por inserção do grupo carbodiimida

Após a reação, evaporou-se o solvente e a fase aquosa foi lavada com acetado de etilo de forma a remover composto **10** que não tenha reagido. De seguida fez-se uma lavagem com solução ácida para libertar o anião carboxilato e extraiu-se com acetato de etilo, obtendo-se o composto **22** com um rendimento de 12%.

O composto **22** foi confirmado por espectroscopia de ^1H -RMN. A introdução do grupo carbodiimida é certificada pelos sinais dos prótons do grupo *tert*-butilo sob a forma de dois singuletos a 1,40 e 1,45 ppm a integrar na totalidade para 18 prótons. Apesar da dificuldade em atribuir os sinais dos prótons a campo alto relativos à estrutura da L-prolina e das diferenças de integração, os 18 prótons dos sinais a 1,40 e 1,45 ppm relacionam-se perfeitamente com os sinais dos prótons a campo baixo correspondentes aos prótons aromáticos, que apresentam na totalidade uma integração de 5 prótons. Para uma completa elucidação estrutural deste composto é necessário realizar espectros de ^{13}C , bidimensionais assim como espectros de massa.

2.12 Preparação de reagentes de Grignard

Um dos processos para a formação da ligação amida fundamenta-se na adição de reagentes de Grignard a isocianatos tal como descrito na literatura.^{9,25} Para tal, à parte do brometo de fenilmagnésio que foi usado a partir de uma solução em THF disponível comercialmente, foi necessário proceder-se à síntese de reagentes de Grignard do ácido isoferúlico e derivados. A estratégia usada encontra-se esquematizada na figura 2.39.

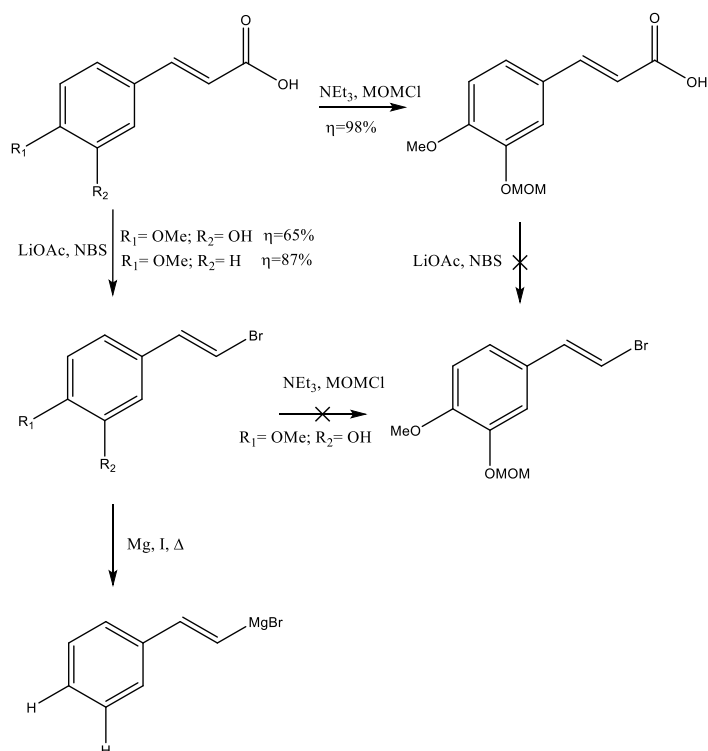


Figura 2.39 - Esquema geral da metodologia sintética adotada para a preparação de bromo estirenos e conversão em reagentes de grignard

2.12.1 Proteção do átomo de oxigênio do ácido isoferúlico

Esta reação consistiu na proteção seletiva do átomo de oxigênio do anel aromático com o grupo MOM. Fez-se reagir o ácido isoferúlico com MOMCl na presença de NEt₃, usando THF como solvente, representado na figura 2.40.

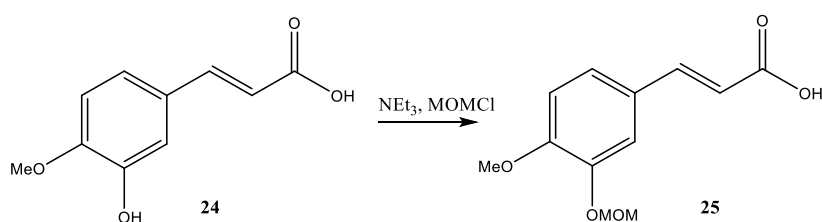


Figura 2.40 – Síntese de ácido (E)-3-(4-metoxi-(dimetoxi)fenil)acrílico 24

Após o *work-up*, que consistiu em adicionar celite ao balão e evaporar o solvente orgânico e de seguida efetuar lavagens com hexano. Evaporou-se o hexano à secura e obteve-se o composto **25** com 98% de rendimento.

A estrutura do composto **25** foi confirmada por ¹H-RMN pelos sinais singuletos a 3,54 ppm, a integrar para 3 protões e 5,39, a integrar para 2 protões, correspondentes ao CH₃ terminal e ao CH₂ do grupo MOM. A campo baixo observa-se os protões aromáticos

e os sinais dupletos correspondentes aos prótons da dupla ligação a 7,72-7,68 ppm e 6,35-6,31 ppm com uma constante de acoplamento de 16 Hz.

2.12.2 Halodescarboxilação

De forma a preparar os reagentes de Grignard foi necessário descarboxilar o grupo ácido e bromar essa posição. Para tal recorreu-se a uma reação catalítica de Hunsdiecker, descrita na literatura por Chowdhury et Roy.³¹

2.12.2.1 Síntese de (E)-4-(2-bromovinil)-1-metoxi-2-(metoximetoxi)benzeno (25)

Esta reação envolveu a adição de *N*-bromo-succinamida (NBS) ao composto **25** na presença de acetato de lítio em quantidade catalítica, usando como solvente uma mistura de 97:3 de acetonitrilo e água (Fig. 2.41).

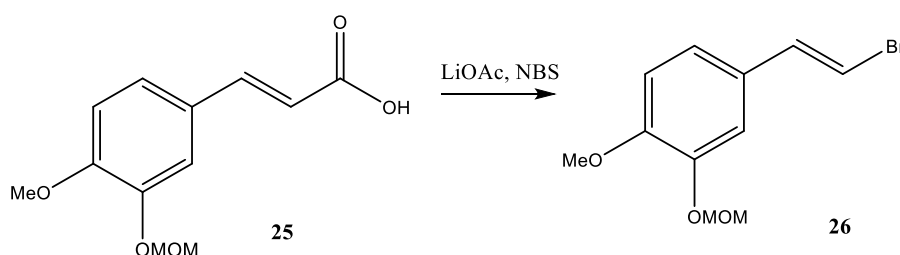


Figura 2.41 - Síntese de (E)-4-(2-bromovinil)-1-metoxi-2-(metoximetoxi)benzeno **26**

Ao seguir-se a reação por c.c.f, e revelação com iodo, verificou-se a formação de uma mistura complexa de manchas. Pelo que se decidiu descarboxilar e bromar o composto **24** em primeira instância e de seguida proteger o grupo hidroxilo do anel aromático com MOM (Fig. 2.42).

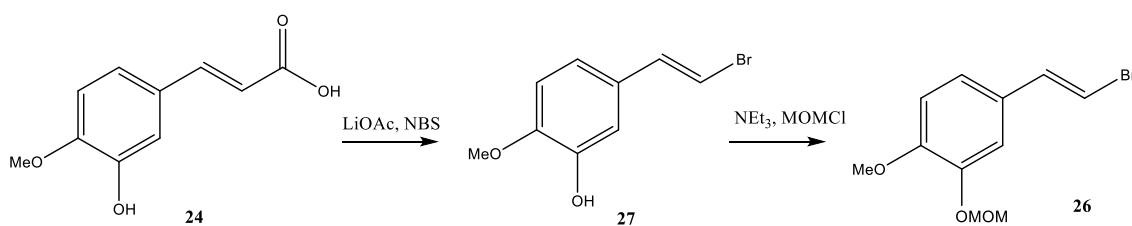


Figura 2.42 - Síntese do composto **26** iniciando-se por a halodescarboxilação de **24**

De forma análoga ao procedimento anterior, conseguiu-se obter o composto **27** com um rendimento de 64% após *work-up* que consistiu na adição de celite e evaporação do solvente orgânico, seguido de lavagens com n-hexano.

O composto **27** foi caracterizado por espectroscopia de IV e ¹H-RMN. No espectro de IV verifica-se a presença de uma banda larga característica do grupo álcool do anel aromático a 3510 cm⁻¹, e a 3077 e 2961 cm⁻¹ bandas fortes distintivas do estiramento das ligações C_{sp2}-H do anel aromático e C_{sp3}-H da cadeia alifática, respetivamente.

No espectro de ¹H-RMN do composto **27** identifica-se o singuleto a 3,92 ppm, a integrar para 3 prótons, relativo aos prótons do grupo metoxilo, o sinal a 5,76-5,69 ppm, com integração de 1 próton, correspondente ao H-7 e a 7,06-7,08 ppm relativo ao outro próton (H-8) da ligação dupla. Os sinais dos prótons aromáticos surgem num multiplete a 6,88-6,82 ppm e um duplete a 6,64-6,61 ppm, a integrar na totalidade para 3 prótons.

O mecanismo reacional para a formação de **27** (Fig 2.43) envolve a coordenação do átomo de lítio ao oxigénio do NBS, provocando uma deslocalização eletrónica e tornando o átomo de bromo mais suscetível ao ataque do carbono da ligação dupla do composto **24**. Aquando da formação da ligação C-Br se formar ocorre a libertação de succinamida, e a recuperação da ligação dupla provoca a descarboxilação, ocorrendo a libertação de CO₂, tornando a formação do produto **27** entropicamente favorável.

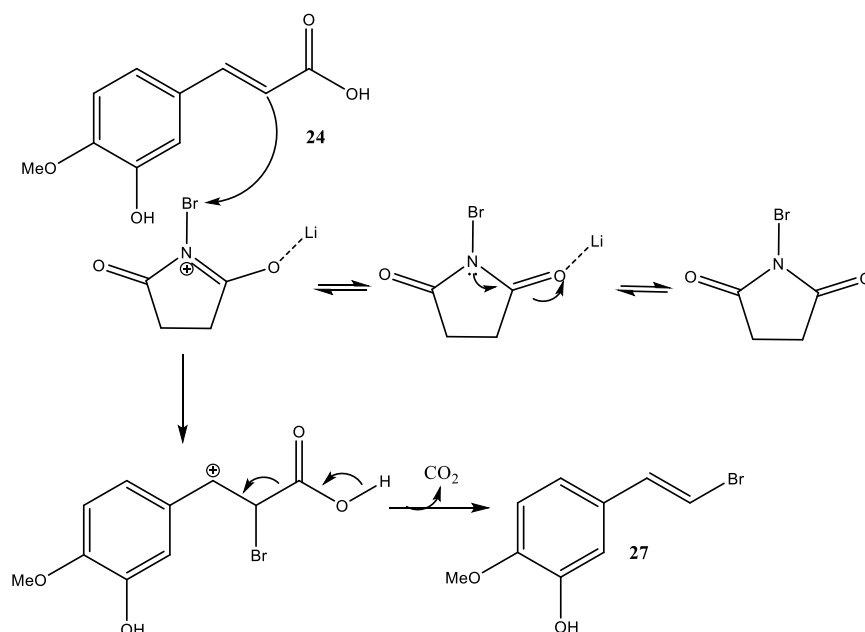


Figura 2.43 – Mecanismo proposto para a reação catalítica de Hunsdiecker

Quando se tenta proteger o composto **27** com o grupo MOM, na presença de NEt_3 para obter o **26**, observa-se consumo do material de partida por c.c.f (revelação com KMnO_4). Ao fim de 45 min, parou-se a reação e evaporou-se o solvente orgânico, extraiu-se o composto e após secagem, fez-se um espectro de ^1H -RMN que apresenta uma grande mistura de sinais tanto a campo alto, como a campo baixo. Por tal, não se chegou a confirmar a estrutura do composto **26**.

2.12.2.2 Síntese de (*E*)-1-(2-bromovinil)-4-metoxibenzeno (**27**)

Para obtenção do composto **28**, fez-se reagir o ácido 4-metóxicinâmico (**29**) segundo a reação catalítica de Hunsdiecker (Fig.2.44).

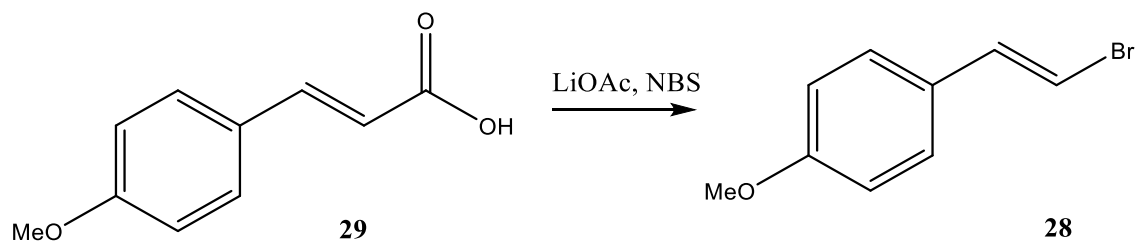


Figura 2.44 - Síntese do (*E*)-1-(2-bromovinil)-4-metoxibenzeno (**28**)

O composto **28** foi obtido com um rendimento de 87%, e caracterizado por ^1H -RMN. No espetro de ^1H -RMN verifica-se a presença de um sinal singuleto a 3,83 ppm a integrar para 3 prótons relativos ao grupo metoxilo do anel aromático, os sinais dupletos dos prótons da ligação dupla a 7,08-7,05 ppm e 6,65-6,62 ppm. Tal como os sinais duplo dos prótons aromáticos a 7,27 e 6,67 ppm.

2.13 Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar a cernumidina (**1**) e análogos.

Na primeira abordagem sintética usou-se a 2-pirrolididona como material de partida (Via A) que demonstrou ser ineficaz, pois não se obtiveram os resultados esperados. Por esta razão e pelo facto de os compostos a sintetizar se apresentarem como uma mistura racémica, decidiu-se descartar esta via, e usar a L-Prolina como material de partida.

Ao contrário da via A, as metodologias que usam a L-Prolina como material de partida, apresentam desde início um centro estereogénico com a quiralidade desejada que é de esperar manter-se ao longo da síntese. Este facto não foi confirmado neste trabalho onde todos os esforços foram colocados no desenvolvimento da via metodológica. Também a impossibilidade de realizar a medição da rotação ótica não permitiu esta análise. Em trabalho futuro espera-se poder realizar estas análises.

O passo chave para a estratégia sintética baseou-se na formação de acil azidas seguido do rearranjo de Curtius e consequente condensação do intermediário isocianato com nucleófilos de carbono de forma a se obter análogos da cernumidina (**1**).

Para a formação de acil azidas concluiu-se que o melhor procedimento foi o método em que se recorreu ao uso de NMM/cloroformiato de isobutilo/ KH_2PO_4 com rendimentos de 69% em comparação com o rendimento de 36% quando se usou cloroformiato de etilo/trietilamina. Mas ao longo do trabalho, a passagem a isocianato revelou ser problemática. Para tal contribui alguma literatura errónea. Inicialmente não se observou por IV o consumo total de acil azidas pelo que se tendeu a prolongar o tempo reacional destas reações, e os compostos obtidos a partir destes isocianatos revelaram ter espetros de RMN complexos e com muito baixos rendimentos. A otimização deste procedimento foi morosa, mas a diminuição drástica do tempo reacional de formação do

isocianato com o aumento da temperatura (tolueno, a 65 °C durante 30 min) permitiu após armadilha com brometo de fenil magnésio a formação do composto *N-terc*-butil 1-carboxilato-2-benzamidopirrolidina (**17**) com um rendimento de 45%.

A síntese do composto *N-terc*-butil (*E*)-((2-benzamidopirrolidin-1-il)((*terc*-butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (**22**) foi também ensaiado por duas vias alternativas. O procedimento envolvendo a remoção do grupo Boc do composto **17** e inserção do grupo carbodiimida permitiu a obtenção de (**22**) com um rendimento de 21% ao invés do procedimento envolvendo a conversão *in situ* de *N*-Boc-carbamoyl-2-(azidocarbonil)prolina (**15**) ao isocianato e posterior hidrólise à amina e reação com o cloreto de benzoilo.

Verificou-se ao longo da síntese que a via C demonstrou apresentar rendimentos mais baixos, provavelmente devido à inserção da carbodiimida no primeiro passo. O grupo carbodiimida apresenta uma estrutura com dois átomos de azoto podendo provocar interações electroestáticas e ligações por ponte de hidrogénio indesejadas com os reagentes usados nas reações consequentes. Para além disso, este grupo pode provocar, também, um maior impedimento estereoquímico na posição em que se procede à derivatização da L-prolina (H-2).

Verificou-se, também, que o melhor processo para obtenção dos derivados da cernumidina (**1**) foi a condensação com reagentes de Grignard. Na preparação de reagentes de Grignard a partir de derivados do ácido ferúlico, a proteção do átomo de oxigénio com MOM revelou ser problemática, não se tendo atingido os produtos respetivos. Uma abordagem com outros grupos de proteção poderia ser favorável neste sentido. Em todo o caso, a reação catalítica de Hunsdiecker para a formação de brometos e posterior transformação a Grignard para derivados do ácido ferúlico sem a presença de grupos hidroxilo revelou-se ser um sucesso.

Para perspetivas futuras, a síntese de mais análogos do ácido ferúlico e respetiva condensação com isocianatos poderão permitir atingir a síntese do composto **1** e derivados, após a inserção do grupo carbodiimida. Estes derivados poderão também ser sujeitos a estudos de atividade biológica face à produção de IL-8. Para além disso, o núcleo C4-N-aminoguanidina sintetizado baseado na L-prolina pode vir a ser usado em estudos de organocatálise.

3. Parte experimental

3.1 Preâmbulo

A componente experimental deste trabalho envolveu o recurso a procedimentos gerais de laboratório, descritos abaixo:

Os solventes e reagentes utilizados durante a parte laboratorial desta dissertação foram obtidos à *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar* e *Scharlau*. A secagem dos solventes, quando necessárias, foram efetuadas de acordo com a literatura.³²

As reações foram controladas através de cromatografia de camada fina (c.c.f) efetuadas em placas de sílica *Kieselgel* GF 254 com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio, e a sua revelação foi feita recorrendo a luz ultravioleta (UV) a 254 nm e/ou 366 nm e quando necessário através de reveladores, tais como ninidrina, reagente de Dragendorff, KMnO_4 , ácido fosfomolíbico.

A medição do pH efetuou-se com papel indicar universal (*Merck*).

Os compostos foram purificados através de colunas de sílica gel *flash* (*Kieselgel* 60 (*Merck*) ou (*Scharlau*) de granulometria 230 – 400 *mesh* como fase estacionária. As cromatografias em camada preparativa foram efetuadas em placas de sílica *Merck Kieselgel* GF 254 com espessura de 0,25 mm, 0,5 mm ou 1 mm.

A caracterização dos compostos obtidos foi feita através de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (*Brucker ARX400*), sendo os espectros de próton traçados a 400 MHz e os de carbono a 101 MHz sendo as constantes de acoplamento, J, dadas em Hertz (Hz). Utilizou-se como solventes clorofórmio deuterado (CDCl_3), e água deuterada (D_2O). A descrição dos espectros obedece ao seguinte formato: solvente deuterado; desvio químico de cada sinal (δ , em ppm); intensidade relativa de cada sinal (nH, n.º de prótons); multiplicidade do sinal; constante de acoplamento (J, em Hertz); atribuição na molécula, sempre que possível. A referência utilizada são os sinais do solvente.

A espectroscopia de infra-vermelho (IV) foi feita no espectrofotómetro *Perkin Elmer Spectrum Two* em suporte de pastilhas de KBr ou discos de NaCl. As bandas são apresentadas segundo o número de onda de absorção máxima (ν_{\max}) cm^{-1} .

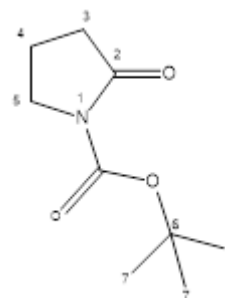
A espectrometria de massa (ESI-MS) foi efetuada num espetrómetro de massa *LTQ Orbitrap XL* (*Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany*) controlado por *LTQ Tune Plus 2.5.5* e *Xcalibur 2.1.0*. A descrição destes espectros obedece ao seguinte formato: massa (m/z); atribuição na molécula. A designação $[M+H]^+$ corresponde sempre ao ião molecular de interesse. A cromatografia gasosa acoplada a massa (GC-MS) foi feita num cromatógrafo *Agilent 6890N*, acoplado a um detetor *Thermo DSQ*, de impacto eletrónico (EI) (REQUIMTE/FCT).

3.2 Reação de proteção da 2-pirrolidona

3.2.1 Síntese de *N*-terc-butil 1-carboxilato-2-oxopirrolidina (**7**)

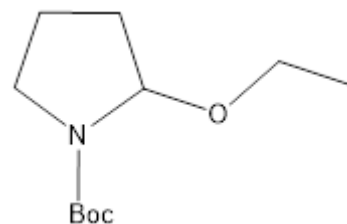
Pesou-se 3,7 mg de DMAP (0,05 eq, 0,03 mmol) para um balão e adicionou-se 0,45 mL de 2-pirrolidona (1 eq, 0,58 mmol), sob agitação e atmosfera de azoto. Adicionou-se 8,5 mL de acetonitrilo seco, seguido de 1,48 mL de di-*terc*-butil-dicarbonato (1,1 eq, 0,6 mmol). Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano com metanol a 5%, revelação com ácido fosfomolíbdico, R_f 0,1), em que se detetou a ausência do composto de partida e a formação do produto. Ao fim de 2h30, evaporou-se o solvente, e procedeu-se para uma coluna cromatográfica, diclorometano com 5% metanol. Obteve-se 865 mg do composto **7**, com 79% de rendimento, de um óleo amarelo.

IV (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 2979 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$), 1782 e 1713 (C=O); **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)** 3,72-3,68 (2H, m, H-5), 2,47-2,43 (2H, m, H-3), 1,99-1,92 (2H, m, H-4), 1,48 e 1,45 (9H, s, H-7); **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm)** 174,30 (C=O), 150,13 (C=O), 82,61 (C-6), 46,44 (C-5), 32,88 (C-3), 27,95 (C-7), 17,34 (C-4).



3.3 Síntese de 2-etoxipirrolidina-1-carboxylato de *terc*-butilo (8)

Num balão de 2 tubuladuras colocou-se 1 eq de **7** em etanol. Adicionou-se ao balão, em banho de gelo, entre 2 a 12 eq de borohidreto de sódio. As reações foram efetuadas tanto em banho de gelo, como à temperatura ambiente e a refluxo. Seguiu-se as reações por c.c.f (diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff).

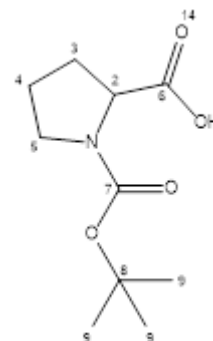


Para o *work-up*, adicionou-se água destilada, extraiu-se com éter etílico, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Nas tentativas efetuadas, o produto pretendido não foi obtido.

3.4 Reação de N-derivatização da L-prolina

3.4.1 Síntese de *N-terc*-butiloxicarbonil-S-prolina (**3**)

A uma solução de L-prolina (20 mg, 1,0 eq, 1,7 mmoles) em 10 mL de 1,4-dioxano e 5 mL de água destilada, sob agitação e atmosfera de azoto, adicionou-se 0,9 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio 2M (1 eq). Arrefeceu-se a mistura à temperatura de 0 °C, e adicionou-se 0,43 mL de di-*terc*-butil-dicarbonato (1,1 eq, 1,9 mmol). Após a adição deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente. Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano/metanol (7:3), revelação com ninidrina, Rf 0,16), em que se foi detetando o desaparecimento da L-prolina. A reação decorreu durante 24h. O solvente orgânico foi removido a pressão reduzida, e o resíduo aquoso foi lavado com acetato de etilo. Desprezou-se a fase orgânica, e a fase aquosa foi acidificada com ácido clorídrico 1M até pH 2. Extraiu-se com acetato de etilo, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se, evaporou-se o solvente orgânico. Obteve-se o composto **3** (268 mg) como um sólido branco, com 84% de rendimento. **IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹)** 3200-2500 (OH), 2977 (C-alif), 1738 e 1638 (C=O). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)**: (Presença de rotâmeros) 4,37-4,26 (1H, q, H-2), 3,57-3,38 (2H, m, H-5), 2,29 (1H, s, H-3a), 2,08 (1H, m, H-3b), 1,98-1,92 (2H, m, H-4), 1,50 e 1,44 (9H, s, H-9). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm)**: (Presença de rotâmeros) 178,51 e 175,15 (C-6), 156,76 e 153,89 (C-7), 81,66 e 80,35 (C-8), 59,22 e 58,92 (C-2),

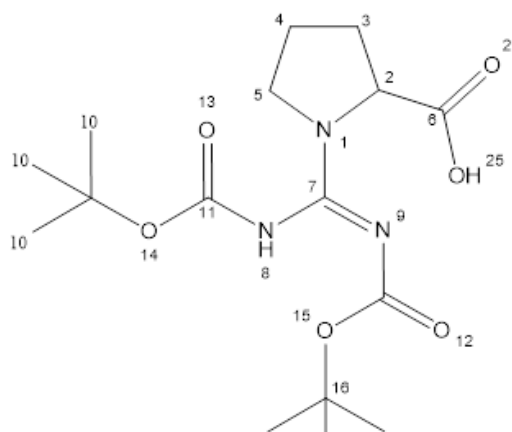


47,08 e 46,34 (C-5), 30,83 (C-3), 28,59 e 28,38 (C-9), 24,33 e 23,65 (C-4). GC-MS: 216 [M+H]⁺, 170 [M-CO₂]⁺, 70 [prolina-H]⁺, 57 [C₄H₉]⁺

3.4.2 Síntese de *N,N'*-di(*tert*-butiloxicarbonil)carbamimidoil-L-prolina (*N*-Boc-carbamoil-prolina, **11**)

Método A

A uma solução de L-prolina (200 mg, 1,0 eq, 1,7 mmol) em 10 mL de 1,4-dioxano e 5 mL de água destilada, sob agitação, adicionou-se 0,88 mL de solução carbonato de sódio 2M (1,0 eq), e 500 mg de 1,3-di-(*tert*-butiloxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudoureia (**10**) (1,2 eq, 1,7mmoles). Colocou-se a mistura a refluxo. Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano/metanol



(9:1), revelação com ninidrina R_f 0,4), em que se detetou o desaparecimento de L-prolina. Ao fim de 96 h, evaporou-se o solvente orgânico, e procedeu-se para uma coluna cromatográfica, diclorometano/metanol (9:1). Obteve-se 251 mg de um sólido branco (**11**) com um rendimento de 40%.

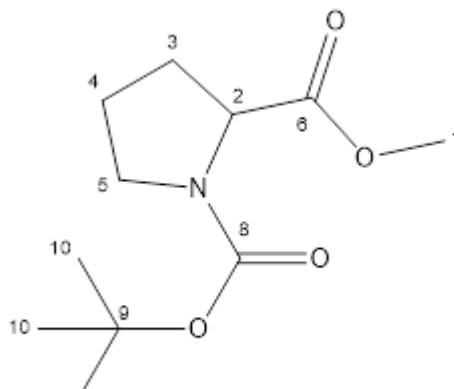
Método B

A uma solução de L-prolina (240 mg, 1,0 eq, 2 mmol) em 10 mL de 1,4-dioxano e 5 mL de água destilada, sob agitação e em banho de gelo, adicionou-se 0,9 mL de solução carbonato de sódio 2M (1,0 eq), e 570 mg de 1,3-di-(*tert*-butiloxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudoureia (**10**) (1,2 eq, 2 mmol). Retirou-se o banho de gelo após adição e seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano/metanol (9:1), revelação com ninidrina, R_f 0,4), em que se detetou o desaparecimento do composto de partida. Ao fim de 96 h, parou-se a reação, evaporou-se o solvente orgânico. Lavou-se a fase aquosa com acetato de etilo, acidificou-se a fase aquosa até pH 2 e extraiu-se com acetato de etilo. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se à secura, obtendo-se 274 mg de um sólido cristalino branco (**11**) com um rendimento de 61%. **IV (NaCl)** ν_{\max} (cm⁻¹) 3258 (COOH), 2980 (C-alif), 1747 (C=O), 1622 (C=O). ¹H NMR (400 MHz, CO(CD₃)₂) δ

(ppm): 4,46 (1H, t, $J=6\text{Hz}$, H-2), 3,57-3,52 (2H, m, H-5), 2,10-2,05 (2H, m, H-3), 1,86-1,80 (2H, m, H-4), 1,36 e 1,31 (18H, s, H-10). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$) δ (ppm): 171,24 (C-6), 154,76 (C-7,10,11), 82,08 (C-16,20), 63,22 (C-4), 49,96 (C-2), 28,02 (C-5), 27,91 (C-17,18,19,21,22,23), 24,19 (C-1). ESI-MS: 358,1973 calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_6^+$, obtido 358,19671 (Δ 1,5 ppm).

3.5 Reação de metilação *N*-terc-butiloxicarbonil-S-prolina: Síntese de S-pirrolidina-1,2-dicarboxilato de 2-metilo 1-terc-butilo (*N*-Boc-prolina metil éster, 13)

A uma solução de **3** (270 mg) em 10 mL de metanol, sob agitação, adicionou-se 6,5 mL de solução de diazometano preparada de acordo com a literatura.³³ Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano, revelação com ninidrina, R_f 0,2), em que se detetou a ausência do composto de partida e a formação de um novo produto. O solvente orgânico foi evaporado à securo, obtendo-se um óleo incolor (243 mg) com 85% de rendimento (**13**). ^1H NMR (400 MHz,

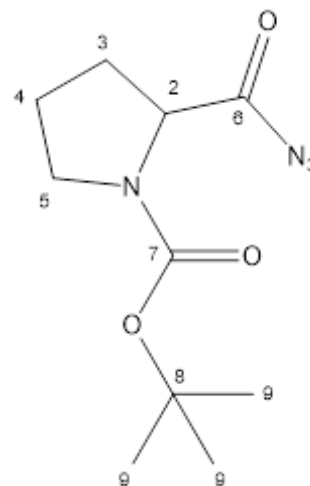


CDCl_3) δ (ppm): (Presença de rotâmeros) 4,32-4,19 (1H, mq, H-2), 3,70 (3H, s, H-7), 3,52-3,37 (2H, m, H-5), 2,21-2,16 (1H, m, H-3a), 1,93-1,85 (3H, m, H-3b, H-4), 1,44 e 1,39 (9H, s, H-10). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): (Presença de rotâmeros) 173,72 e 173,48 (C-6), 154,40 e 153,74 (C-8), 79,80 e 79,75 (C-9), 59,07 e 58,69 (C-2), 52,04 e 51,88 (C-7), 46,52 e 46,27 (C-5), 30,84 e 29,88 (C-3), 28,39 e 28,26 (C-10), 24,30 e 23,65 (C-4).

3.6 Síntese de *terc*-butil-1-carboxilato 2-*S*-azidocarbonil pirrolidina (**12**)

Método A

Colocou-se 192 mg de 1-*terc*-butil-1,2-dicarboxilato 2-metil-*S*-pirrolidina (**13**) (1,0 eq, 0,8 mmol) num balão em 5 mL de etanol, e adicionou-se, gota a gota, 0,08 mL de hidrato de hidrazina (2,0 eq, 1,6 mmol). Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano/metanol (9:1), revelação com ninidrina, R_f 0,1), em que se detetou a ausência do composto de partida e a formação de um novo produto. O solvente orgânico foi evaporado à secura, obtendo-se um óleo que foi tratado com 1 mL de uma solução de HCl:CH₃COOH (10:1) adicionada lentamente. De seguida, adicionou-se, gota a gota, uma solução de nitrito de sódio (64 mg, 1,1 eq, 0,9 mmol). Extraíu-se com clorofórmio e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se. Tendo-se obtido um óleo amarelo que segundo espectroscopia de IV e RMN conclui-se ser material de partida, o composto **13**.



Método B

Dissolveu-se 103,2 mg de **3** (1,0 eq, 0,5 mmol) em 1,5 mL de THF seco, e adicionou-se 0,1 mL de trietilamina (1,6 eq), sob agitação e atmosfera de azoto. Arrefeceu-se a mistura reacional à temperatura de -20 °C e adicionou-se 0,04 mL de cloroformiato de etilo (0,85 eq). Subiu-se a temperatura gradualmente até -10 °C e adicionou-se 60 mg de azida de sódio (2,0 eq) dissolvida em água destilada. Após a adição deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente. Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano, revelação com ninidrina, R_f 0,8), em que se detetou a formação de um novo produto e consumo do material de partida. Ao fim de 1h30, adicionou-se água destilada (10 mL) e procedeu-se a extrações com acetato de etilo. Lavou-se a fase orgânica com solução de carbonato de sódio, seguido de água destilada, e *brine*. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se, e evaporou-se o solvente orgânico à secura. Obteve-se 72,7 mg de de um óleo, com rendimento de 65% (**12**). **IV (NaCl)** ν_{\max} (cm⁻¹): 3434 (OH), 2977 e 2875 (C-alif), 2138 (CON₃), 1696 e 1647 (C=O)

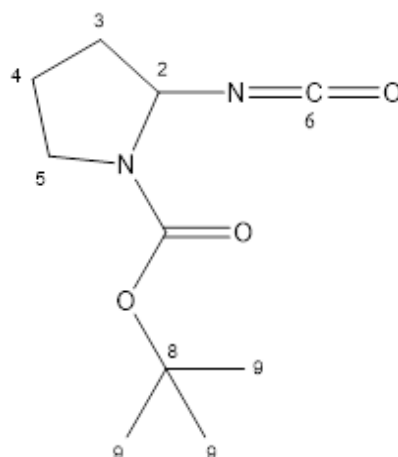
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,30-4,18 (1H, m, H-2), 3,59-3,40 (2H, m, H-5), 2,30-2,19 (1H, m, H-3a), 2,08-1,88 (3H, m, H-3b e H-4), 1,49 e 1,45 (9H, s, H-13,14,15).

Método C

Dissolveu-se 132 mg de **3** (1,0 eq, 0,6 mmol) para um balão em 5 mL de THF seco. Adicionou-se 0,075 mL de NMM (1,1 eq, 0,7 mmol) lentamente. Adicionou-se, a -10 °C, 0,09 mL de cloroformiato de isobutilo (1,1 eq, 0,7 mmol). Após 20 min sob agitação, subiu-se a temperatura até 0 °C, e adicionou-se 251 mg de KH_2PO_4 (3 eq, 1,8 mmol), seguido de 65 mg de NaN_3 (1,5 eq, 0,9 mmol) em 2 mL de água destilada. Após a adição deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente. Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano com 2% de metanol, revelação com Dragendorff, R_f 0,85). Ao fim de 2h observou-se o desaparecimento do substrato de partida e confirmou-se a formação da azida por IV (2139 cm^{-1}). Separou-se as fases, e evaporou-se o solvente orgânico, adicionou-se 30 mL de acetato de etilo. Lavou-se com 10 mL de água destilada, 20 mL de solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, 10 mL de solução de HCl a 10%, e 10 mL de *brine*. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à secura. Obteve-se 77 mg de um óleo incolor com 89% de rendimento (**12**). **IV (NaCl) v_{max} (cm^{-1}):** 3429 (H_2O), 2978 e 2882 (C-alif), 2139 (CON_3), 1702 (C=O). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 4,30-4,19 (1H, m, H-4), 3,55-3,40 (2H, m, H-2), 2,30-2,19 (1H, m, H-5a), 2,00-1,90 (3H, m, H-1,5b), 1,54-1,45 (9H, d, H-9).

3.7 Síntese de *terc*-butil-1-carboxilato 2-*S*-isocianatopirrolidina (**14**)

Adicionou-se 5 mL de diclorometano seco a 72,7 mg de **12** e colocou-se em banho de óleo a 50-60 °C. Monitorizou-se a reação por IV, observando-se o aparecimento da banda característica deste grupo funcional isocianato (2246 cm^{-1}) e o desaparecimento da banda de *stretching* correspondente ao grupo azida (2138 cm^{-1}). Ao fim de 3h, evaporou-se o solvente orgânico, e obteve-se 20 mg de um óleo com um rendimento de 30% (**14**). **IV (NaCl) v_{max} (cm^{-1}):** 2978 (C-alif), 2246 (NCO), 1685 (C=O) **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** (Presença de



rotâmeros) 5,62-5,25 (1H, m, H-2), 3,57-3,49 (1H, m, H-5a), 3,37-3,30 (1H, m, H-5b), 2,19-1,98 (4H, m, H-3, 4), 1,53-1,49 (9H, s, H-9)

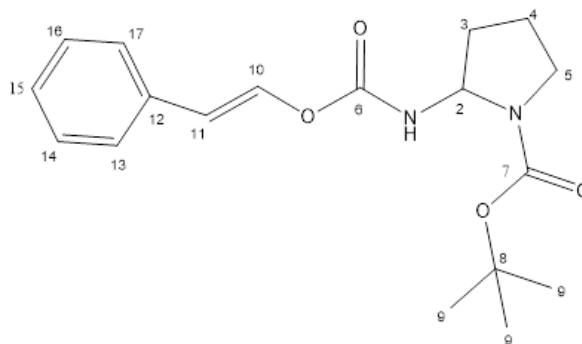
3.8 Reações de *tert*-butil-1-carboxilato 2-*S*-isocianatopirrolidina (**14**):

Síntese de *tert*-butil-1-carboxilato 2-*S*-((amino)carbonil)cinamiloxi)pirrolidina (**16**)

Colocou-se 0,04 mL de álcool cinâmico (1,1 eq, 0,3 mmol) em 3 mL de THF seco, sob agitação e atmosfera de azoto e em banho de gelo, ao qual se adicionou 0,01 mL de hidreto de sódio (1,1 eq, 0,6 mmol) dissolvido em THF seco.

Adicionou-se 60 mg de **14** (1,0 eq, 0,3

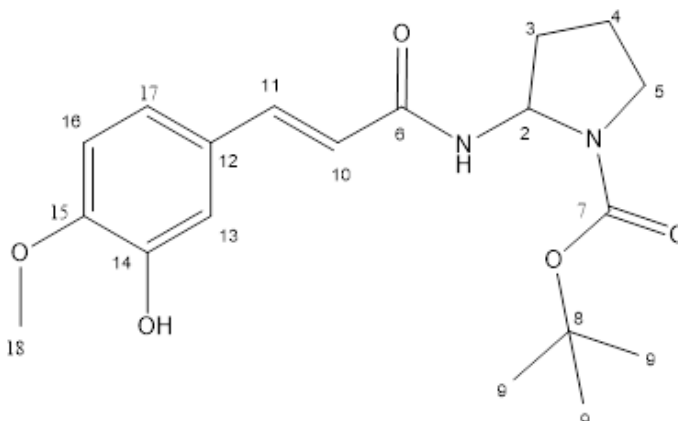
mmol) dissolvido em THF seco, gota a gota. Retirou-se o banho de gelo. Monitorizou-se a reação por IV, observando-se o desaparecimento da banda de isocianato (2246 cm^{-1}). Ao fim de 72h, evaporou-se o solvente e procedeu-se para uma coluna cromatográfica, diclorometano, obtendo-se uma mistura de composto e impurezas. Fez-se placa preparativa (0,25 mm) desta mistura, diclorometano com 2% metanol.



3.9 Hidrólise do isocianato a amina e reações de N-acilação

3.9.1 Síntese de *N*-*tert*-butil 1-carboxilato-(*E*)-2(3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilamida)pirrolidina (**20**)

Num balão, dissolveu-se 144 mg de **14** em 5 mL de diclorometano seco, e adicionou-se 1 mL de hidróxido de potássio 1%. Seguiu-se a reação por IV, observando-se o desaparecimento da banda de isocianato (2246 cm^{-1}). De

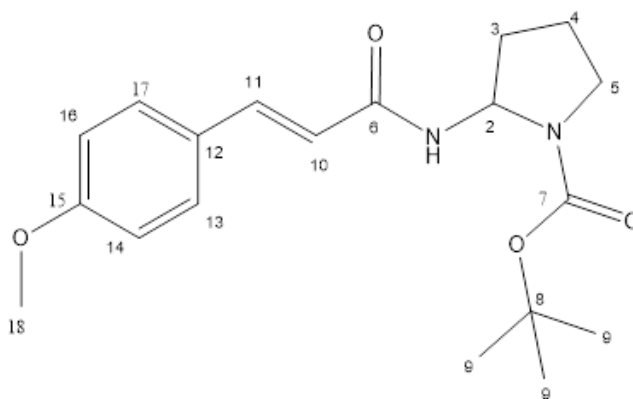


seguida, parou-se a reação e separou-se as fases, desprezando a fase aquosa. Adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Esta solução é, então, adicionada a uma mistura de

110 mg de ácido 3-hidroxi-4-metoxi-cinâmico (1 eq) em 10 mL de diclorometano seco e 0,1372 g de DCC (1.1 eq, 0,6 mmol) e 8 mg de DMAP (0,11 eq, 0,07 mmol). Após 48h, parou-se a reação, evaporou-se à secura, e procedeu-se a uma coluna cromatográfica flash, diclorometano e posterior placa preparativa, obtendo-se 5 mg do composto com 2% de rendimento (**20**). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7,68-7,64 (1H, d, J = 16 Hz, H-11), 7,46-7,44 (2H, d, J = 8 Hz, H-13,17), 6,93-6,91 (2H, d, J = 8 Hz, H-16), 6,65-6,61 (1H, d, J = 16 Hz, H-10), 5,32 (1H, s, H-2), 3,86 (3H, s, H-18), 2,01-1,95 (6H, m, H-5), 1,88-1,84 (5H, m, H-3), 1,76-1,61 (7H, m, H-4), 1,43-1,22 (13H, m, H-9).

3.9.2 Síntese de *terc*-butil-1-carboxilato 2-(3-(4-metoxifenil)acrilamida)pirrolidina (**20a**)

Adicionou-se 0,02 mL de água destilada (9,0 eq) a 99 mg de **14** em diclorometano, e colocou-se a mistura a refluxo. Após 24h, adicionou-se 1 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio a 1%. Retirou-se o refluxo, extraiu-se a fase orgânica, secou-se com sulfato

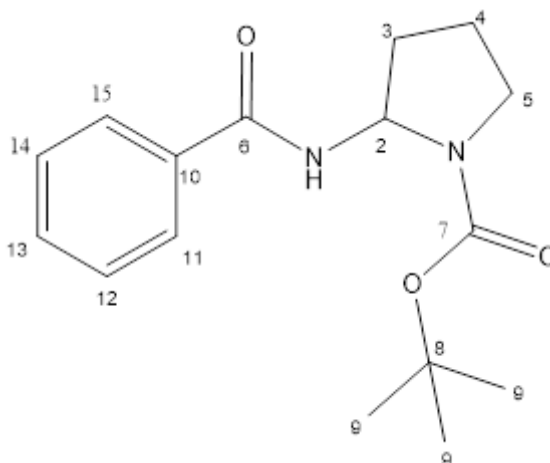


de sódio anidro. Colocou-se a fase orgânica em banho de gelo, e adicionou-se 0,05 mL de trietilamina (1,0 eq, 0,4 mmol) 85 mg de cloreto de ácido 4-metoxi-cinâmico (1,0 eq, 0,5 mmol). Após a adição, retirou-se o banho de gelo, e deixou-se sob agitação 24h. Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano, revelação com Dragendorff, R_f 0,7), em que se detetou a formação de um novo produto. Evaporou-se o solvente orgânico, e fez-se uma purificação em coluna cromatográfica, diclorometano, obtendo-se 38 mg de um sólido (21% de rendimento) (**20a**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,70-7,66 (1H, d, J = 16 Hz, H-11) 7,51-7,48 (2H, d, J = 12 Hz, H-13,17) 6,93-6,91 (2H, d, J = 8 Hz, H-14,16), 6,34-6,30 (1H, d, J = 16 Hz, H-10), 5,50- 5,36 (1H, m, H-2), 3,85 (3H, s, H-18), 3,43-3,34 (3H, m, H-5), 3,16-3,10 (2H, sx, H-3a,4a), 2,07-1,90 (8H, m, H, 3b, 4b), 1,49-1,45 (15H, m, H-9).

3.10 Reações de Grignard

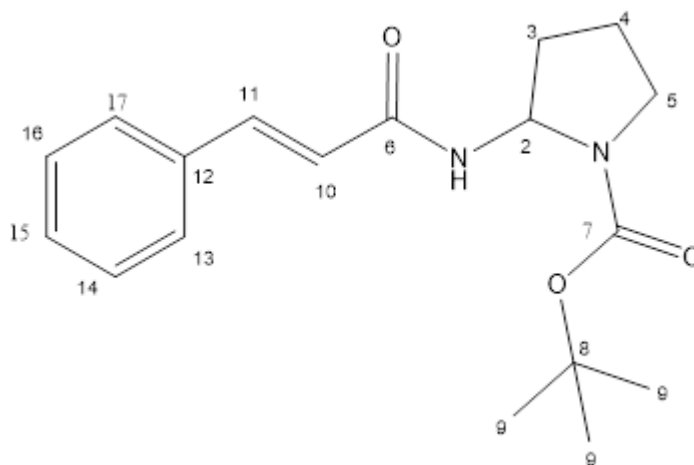
3.10.1 Síntese de *N-terc-butil 1-carboxilato-2-benzamidopirrolidina* (**17**)

Colocou-se 623 mg de **12** (1,0 eq, 2,6 mmol) em 20 mL de tolueno seco, a refluxo (65 °C) durante 20 min. Seguiu-se a reação por IV, observando o consumo de azida e o aparecimento de banda de isocianato (2246 cm^{-1}). Parou-se o aquecimento e colocou-se em banho de gelo. Adicionou-se 0,53 mL de brometo de fenilmagnésio (1 eq, 3,3 mmol) e retirou-se o banho de gelo. Seguiu-se a reação por c.c.f, hexano:acetato de etilo (8:2), revelação com KMnO_4 e Dragendorff, verificando-se a formação do produto. Após 30 min, parou-se a reação, adicionou-se água destilada, evaporou-se o solvente orgânico. Extraíu-se com clorofórmio, secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se. Procedeu-se a purificação por coluna cromatográfica, hexano:acetato de etilo (7:3). Obtendo-se 392 mg com um rendimento de 45% do composto **17**. **IV (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}):** 3310 (NH), 3058 (C-H arom), 2979 (C-alif), 1679 (C=O), 1400 (C=C, arom), 1260 (C-N), **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,78-7,76 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-11, 15), 7,54-7,51 (1H, t, $J = 8$ Hz, H-13), 7,47-7,45 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-12,14), 5,49-5,40 (3H, m, H-2), 3,58-3,50 (5H, m, H-5), 3,37-3,29 (6H, m, H-4), 2,07-1,95 (22H, m, H-3), 1,49-1,44 (44H, m, H-9), **E.M. (IE) m/z :** 313,15 (99%, M^+Na^+), 291,17 (M^+ , 5%), 284,27 (30%), 114,05 (55%), 70,06 (30%).



3.10.2 Síntese de *N-terc-butil-1-carboxilato-2-cinamamidopirrolidina* (**18**)

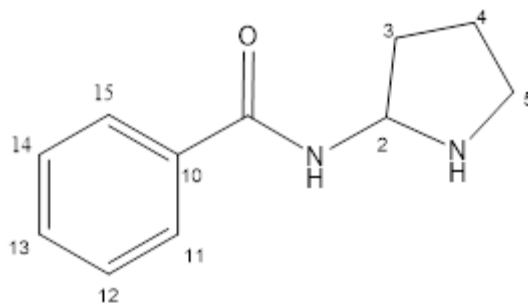
Num balão de 2 tubuladuras com montagem de refluxo e balão de azoto, adicionou-se 0,230 g de **12** (1,0 eq, 1 mmol) em 8 mL de tolueno e colocou-se a refluxo (65 °C). Seguiu-se a formação de isocianato por IV, e após 10 min parou-se o aquecimento e



colocou-se em banho de gelo. Adicionou-se 3 mL de brometo de estireno magnésio e retirou-se banho de gelo. Seguiu-se a reação por c.c.f, diclorometano com 4% de metanol, revelação com Dragendorff. Após 1h, adicionou-se água destilada, evaporou-se o solvente, adicionou-se clorofórmio e extraiu-se com água destilada. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se. Obtendo-se um sólido com 24 mg, com um rendimento de 7% (**18**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,56-7,52 (1H, d, J=16 Hz, H-11), 7,41 (2H, m, H-13,17), 7,26 (3H, d, H-14, 15, 16), 6,36-6,32 (1H, d, J=16 Hz, H-10), 5,74 (1H, m, H-2), 3,46-3,41 (1H, m, H-5a), 3,27-3,21 (1H, m, 5b), 2,05-1,84 (4H, m, H-3, 4), 1,40-1,36 (9H, d, H-9), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167,97 (C-6), 154,22 (C-7), 141,05 (C-11), 134,82 (C-12), 129,66 (C-15), 128,78 (C-14, 16), 127,78 (C-13, 17), 120,69 (C-10), 80,23 (C-8), 64,13 (C-2), 46,08 (C-5), 33,94 (C-3), 28,43 (C-9), 22,42 (C-4). (A atribuição foi confirmada com base em técnicas de COSY, HMBC e HSQC), E.M. (IE) m/z: 339,16 (99%, M⁺Na⁺), 318,18 (M⁺, 25%), 317,18 (M⁺, 99%), 114,05 (40%), 70,06 (25%)

3.11 Reação de remoção do grupo protetor Boc: Síntese de 2-Benzamidopirrolidina (23)

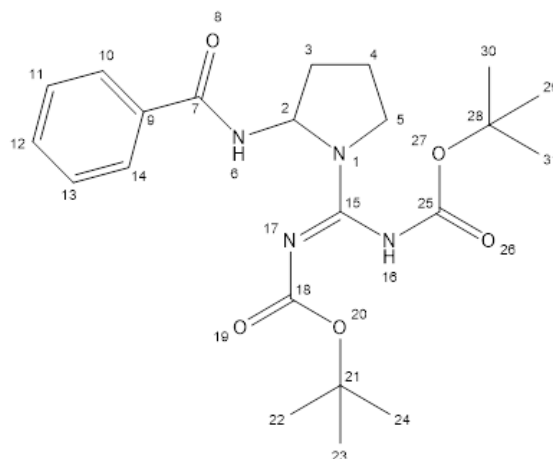
Dissolveu-se 6 mg de **17** em 8 mL diclorometano e colocou-se em banho de gelo. Adicionou-se 0,08 mL de TFA (5 eq, 1 mmol), e retirou-se banho de gelo após adição. Seguiu-se a reação por c.c.f, diclorometano com 10% de metanol, revelação com Dragendorff. Após 2h, adicionou-se 5 mL de água destilada e basificou-se a mistura com solução aquosa Na_2CO_3 2M até pH 10. Extraíu-se com acetato de etilo, lavou-se a fase orgânica com *brine*, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se. Obteve-se 37 mg de **23**. **IV (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}):** 3440 (OH), 2970 e 2867 (C-H arom), 1651 (C=O), 1451 (C=C, arom). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,85-7,83 (2H, d, $J = 8$, H-11, 15) 7,56-7,52 (1H, t, $J = 8$, H-13), 7,47-7,44 (2H, t, $J = 8$, H-12, 14) 3,63-3,46 (6H, m) 2,17-2,12 (2H, m), 2,08-1,99 (5H, m), 1,88-1,79 (5H, m), 1,47-1,38 (22H).



3.12 Síntese de N-*terc*-butil (E)-((2-benzamidopirrolidin-1-il)((*terc*-butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (22)

Método A

A uma solução em tolueno de 47 mg de **15** (1,0 eq, 0,14 mmol) adicionou-se 0,02 mL de trietilamina (1,0 eq, 0,14 mmol) seguido de 0,016 mL de cloreto de benzoilo (1,0 eq, 0,14 mmol) em banho de gelo. Após a adição, retirou-se o banho de gelo e deixou-se a reação atingir a temperatura ambiente. Seguiu-se a reação por c.c.f (diclorometano com 4% de metanol,



revelação com Dragendorff). Após 1h sem alteração, colocou-se a reação a refluxo (65 °C) e adicionou-se algumas gotas de água. Ao fim de 20 min verificou-se a formação de uma mancha nova, pelo que se procedeu à evaporação do solvente. Ao resíduo foi adicionado água, e efetuado extrações com clorofórmio, secou-se o solvente orgânico, evaporou-se e procedeu-se a uma placa preparativa, pelo qual se obteve o composto **22** com um rendimento de 6%. **IV (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}):** 3249 (NH), 2984 (C-H arom), 2933 (C-alif), 1763 e 1679 e 1628 (C=O), **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7.78-7.76 (1H, d, J= 8 Hz, H-10, 14), 7,52-7,40 (2H, m, H-11-13), 4,29-3,40 (5H, m, H-2,5), 2,32-1,67 (8H, m, H-3,4), 1,53 (9H, s, H-22-24, 29-31). ESI-MS, m/z : 433,5285 calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5^+$, obtido 433,22327.

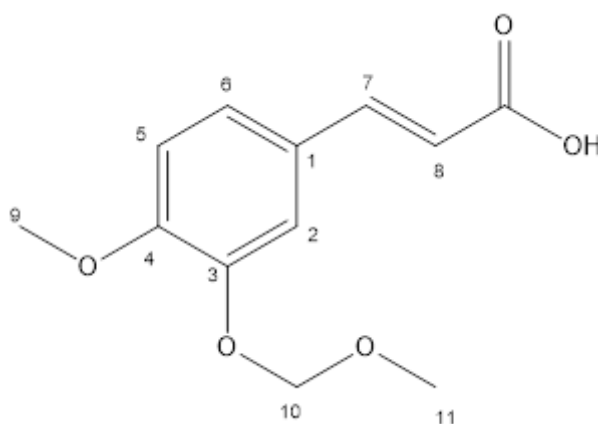
Método B

Colocou-se 37 mg de **23** (1,0 eq, 0,2 mmol) em 6 mL de dioxano e 3 mL de água destilada, sob agitação, adicionou-se 1 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio 2M (1 eq). Arrefeceu-se a mistura à temperatura de 0 °C, e adicionou-se 60 mg de 1,3-Bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudoureia (1,2 eq, 0,2 mmol) . Após a adição deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente e colocou-se em ultrassons durante 1h. Seguiu-se a reação por c.c.f, (diclorometano com 7% de metanol, revelação com Dragendorff). Evaporou-se o solvente e extraiu-se com acetato de etilo. A fase aquosa foi tratada com solução ácida de HCl até pH 2, e extraiu-se com acetato de etilo. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se. Tendo-se obtido o composto **22** com 12% de rendimento. **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,85-7,83 (2H, d, J= 8 Hz, H-10, 14), 7,58-7,54 (1H, t, J= 8Hz, H-12), 7,50-7,46 (2H, t, J= 8 Hz, H-11, 13), 4,49 (2H, s, H-2), 3,63-3,48 (10H, m, H-5), 2,17-2,13 (3H, m, H-3a), 2,09-2,00 (7H, m, H-4), 1,75 (30H, m, H-3b), 1,48-1,40 (18H, d, H-22-24, 29-31).

3.13 Preparação de reagentes de grignard

3.13.1 Reação de proteção do grupo hidroxilo: Síntese de ácido (*E*)-3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acrílico (**25**)

Dissolveu-se 117 mg de ácido 4-metoxi-3-hidroxi-cinâmico (1,0 eq, 0,6 mmol) em 6 mL de THF seco, e adicionou-se 0,16 mL de trietilamina (2,0 eq, 1,2 mmol), em banho de gelo. Adicionou-se 0,06 mL de MOMCl (1,2 eq, 0,7 mmol). Seguiu-se a reação por c.c.f, diclorometano com 2% de



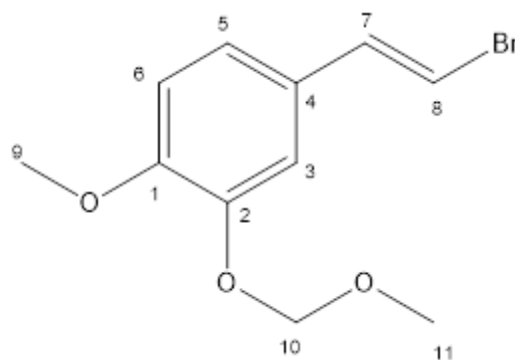
metanol, revelação com iodo. Ao fim de 30 min, parou-se a reação, adicionou-se celite ao balão, e evaporou-se o solvente. Lavou-se a celite com hexano, e evaporou-se o hexano à secura, obtendo-se 140 mg de um óleo viscoso com um rendimento de 98% (**25**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,72-7,68 (1H, d, J= 16 Hz, H-7), 7,12-7,06 (1H, m, H-5, 6), 6,96-6,94 (1H, d, J= 8 Hz, H-2), 6,35-6,31 (1H, d, J= 16 Hz, H-8), 5,96, 5,39 (2H, s, H-10), 3,95 (3H, s, H-9), 3,54 (3H, s, H-11).

3.13.2 Reações de halodescarboxilação

3.13.2.1 Síntese de (*E*)-4-(2-bromovinil)-1-metoxi-2-(metoximetoxi)benzeno (**26**)

Método A

Num balão com 6 mg de acetato de lítio (0,1 eq, 0,2 mmol) em 5 mL de MeCN/H₂O (97:3), adicionou-se 140 mg de **25** (1,0 eq, 0,7 mmol). Após 5 min sob agitação, adicionou-se 114 mg de NBS (1,05 eq, 0,7 mmol). Seguiu-se a reação por c.c.f



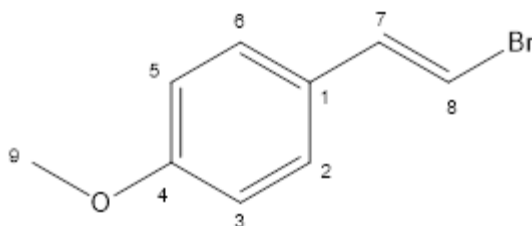
(diclorometano com 2% de metanol, revelação com iodo). Após 1h30 parou-se a reação, obtendo-se uma mistura complexa de manchas.

Método B

Num balão com 108 mg de **27** (1,0 eq, 0,5 mmol) em 8 mL de THF seco adicionou-se 0,130 mL de trietilamina (2,0 eq, 1 mmol) em banho de gelo. De seguida, adicionou-se 0,045 mL de MOM (1,2 eq, 0,6 mmol). Seguiu-se a reação por c.c.f (hexano:acetato de etilo (8:2), revelação com KMnO₄) em que se observou o consumo do material de partida. Ao fim de 45 min, parou-se a reação e evaporou-se o solvente orgânico. Adicionou-se água ao resíduo e extraiu-se com clorofórmio, o qual foi adicionado sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. O espectro de RMN observa-se uma mistura de sinais complexa.

3.13.2.2 Síntese de (*E*)-1-(2-bromovinil)-4-metoxibenzeno (**28**)

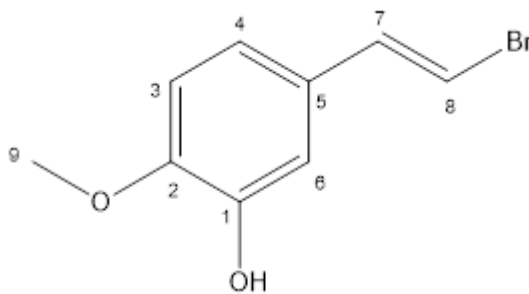
Num balão com 8 mg de acetato de lítio (0,1 eq, 0,2 mmol) em 2 mL de MeCN/H₂O (97:3), adicionou-se 118 mg de ácido 4-metoxicinâmico (1,0 eq, 0,7 mmol). Após 5 min sob agitação, adicionou-se 124 mg de



NBS (1,05 eq, 0,7 mmol). Seguiu-se a reação por c.c.f (Hexano/EtOAc 3:2), após 30 min parou-se a reação. Juntou-se celite ao balão, e evaporou-se o solvente. Lavou-se a celite com hexano, e evaporou-se o hexano à securo, obtendo-se 124 mg de um óleo viscoso com um rendimento de 87% (**28**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,27-7,25 (2H, d, J= 8 Hz, H-2, 6), 7,08-7,05 (1H, d, J= 12 Hz, H-8), 6,89-6,87 (2H, d, J=8 Hz, H-3, 5), 6,65-6,62 (1H, d, J= 12 Hz, H-7), 3,83 (3H, s, H-9).

3.13.2.3 Síntese de (*E*)-5-(2-bromovinil)-2-metoxifenol (**27**)

Num balão com 17 mg de acetato de lítio (0,1 eq, 0,2 mmol) em 6 mL de MeCN/H₂O (97:3), adicionou-se 316 mg de ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico (1,0 eq, 0,7 mmol). Após 5 min sob agitação, adicionou-se 304 mg de NBS (1,05 eq, 0,7 mmol). Seguiu-se a reação por c.c.f (Hexano/EtOAc 8:2), após 24h parou-se a reação. Juntou-se celite ao balão, e evaporou-se o solvente. Lavou-se a celite com hexano, e evaporou-se o hexano à secura, obtendo-se 239 mg de um óleo viscoso com um rendimento de 65% (**27**). IV (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3510 (OH), 3077 (C_{sp2}-H), 2961 (C_{sp3}-H), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,06-7,02 (1H, d, J= 16 Hz, H-8), 6,88-6,82 (2H, m, H-6, 4), 6,64-6,61 (1H, d, J= 12 Hz, H-3), 5,76-5,69 (1H, m, H-7), 3,92 (3H, s, H-9).

3.13.3 Síntese de brometo de estireno magnésio (**30**)

De acordo com o procedimento da literatura⁹, colocou-se 0,7 mL de bromoestireno (1,0 eq) em 10 mL de THF seco e adicionou-se lentamente a um balão em atmosfera de azoto, com 144 mg de magnésio (1.1 eq) (purificado de acordo com a literatura³⁴) e 1 cristal de iodo. Colocou-se a reação a refluxo após adição. Seguiu-se a reação através do consumo de magnésio. Após 1h sem alteração, parou-se a reação e procedeu-se a uma titulação, deduzindo-se uma concentração do composto **30** final de 0,41 mol/L.

3.13.3.1 Titulação de reagentes de Grignard

Num balão seco, colocou-se 315 mg de mentol (2 mmol), 4,16 mg de fenantrolina e barra de agitação. Selou-se com suba e balão de azoto. Adicionou-se 15 mL de THF seco ao balão. Com seringa, adicionou-se 0,1 mL de cada vez da solução do reagente de Grignard até a solução mudar de incolor para violeta e persistir mais do que 1 min.³⁵

4. Bibliografia

1. Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **67**, 2141–2153 (2004).
2. Dias, D. A., Urban, S. & Roessner, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* **2**, 303–336 (2012).
3. Pawar., H. A. Natural Product as a Source of Lead to the Design of New Drugs. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2**, 2–4 (2014).
4. Lopes, L. C. *et al.* Cernumidine and isocernumidine, new type of cyclic guanidine alkaloids from *Solanum cernuum*. *Tetrahedron Lett.* **52**, 6392–6395 (2011).
5. Damasceno, J. L. *et al.* Protective effects of *Solanum cernuum* extract against chromosomal and genomic damage induced by methyl methanesulfonate in Swiss mice. *Biomed. Pharmacother.* **83**, 1111–1115 (2016).
6. Clayden, J. J., Greeves, N., Warren, S. & Wothers, P. *Organic Chemistry*. Oxford University Press **40**, (2001).
7. Pinheiro, S. & Ferreira, V. F. Approaches in assymmetric synthesis. *Quim. Nova* **21**, 312–318 (1998).
8. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
9. Smith, M. B. & March, J. March's advanced Organic Chemistry. (John Wiley & Sons, inc., 2007).
10. Gilman, H. & Kinney, C. R. the Mechanism of the Reaction of Isocyanates and Isothiocyanates With the Grignard Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **46**, 493–497 (1924).
11. Hibbs, D. E. *et al.* Synthesis of Peptides and Pseudopeptides Incorporating an endo- (2 S , 3 R) -Norborn-5-ene Residue as a Turn Inducer. *J. Org. Chem.* **3263**, 1496–1504 (1998).
12. Verardo, G., Bombardella, E., Geatti, P. & Strazzolini, P. Carbamoyl Azides of α -N-Protected Amino Acids: A Fast and Simple One-Pot Synthesis. *J. Synth. Org. Chem.* **2008**, 438–444 (2008).

13. Verardo, G., Bombardella, E., Venneri, C. D. & Strazzolini, P. A Convenient Synthesis of Unsymmetrically Substituted Ureas via Carbamoyl Azides of $\hat{I}\pm$ - N - Protected Amino Acids. *European J. Org. Chem.* **2009**, 6239–6244 (2009).
14. L'abbe, G. Decomposition and addition reactions of organic azides. *Chem. Rev.* **69**, 345–363 (1969).
15. Saunders, J. H. & Slocombe, R. J. The Chemistry of the Organic Isocyanates. *Chem. Rev.* **43**, 203–218 (1948).
16. Pii, P., Science, E., Britain, G. & Sciences, P. An Efficient Synthesis of Magallanesine Using [1,2]-Meisenheimer Rearrangement and Heck Cyclization Ryuji. *Tetrahedron* **52**, 14563–14576 (1996).
17. Nagasaka, T., Hamaguchi, F., Yamamoto, H. & Sugiyama, A. Synthesis of (\pm)-Roxburghilin and (\pm)-Epiroxburghilin. *Heterocycles* **27**, 8–13 (1988).
18. Feichtinger, K., Zapf, C., Sings, H. L. & Goodman, M. Diprotected Triflylguanidines : A New Class of Guanidinylation Reagents. *J. Org. Chem.* **3263**, 3804–3805 (1998).
19. Feichtinger, K., Sings, H. L., Baker, T. J., Matthews, K. & Goodman, M. Triurethane-protected guanidines and triflyldiurethane-protected guanidines: New reagents for guanidinylation reactions. *J. Org. Chem.* **63**, 8432–8439 (1998).
20. Powell, D. A., Ramsden, P. D. & Batey, R. A. Phase-transfer-catalyzed alkylation of guanidines by alkyl halides under biphasic conditions: A convenient protocol for the synthesis of highly functionalized guanidines. *J. Org. Chem.* **68**, 2300–2309 (2003).
21. Pilli, R. A. & Dias, L. C. Trimethylsilyl Trifluoromethanesul Fonate (Tmsotf) Catalyzed Amidoalkylation of Silylenolethers. Stereocontrolled Syntheses of (+/-)-Sedamine and (+/-)-Norsedamine. *Synth. Commun.* **21**, 2213–2229 (1991).
22. Hansen, M. M., Harkness, A. R., Scott Coffey, D., Bordwell, F. G. & Zhao, Y. Substrate acidities and conversion times for reactions of amides with di-tert-butyl bicarbonate. *Tetrahedron Lett.* **36**, 8949–8952 (1995).
23. Nagasaka, T., Tamano, H., Maekawa, T. & Hamaguchi, F. Introduction of Functional Groups Into The alpha-position of N-Alkoxy carbonylpyrrolidines.

- Heterocycles* **26**, 617–624 (1987).
24. Nagasaka, T., Tamano, H. & Hamaguchi, F. Reduction of N-alkoxycarbonyllactams with NaBH₄/EtOH-H⁺: A Facile Synthesis of alpha-Ethoxyurethanes. *Heterocycles* **24**, 1231–1232 (1986).
 25. Purushothaman, K. K., Sarada, A., Connolly, J. D. & Akinniyi, J. A. The Structure of Roxburghilin, a Bis-amide of 2-Aminopyrrolidine from the Leaves of *Aglaia roxburghiana* (Meliaceae). *J. Chem. Soc.* (1979).
 26. Murato, K., Shioiri, T. & Yamada, S.-I. Phosphorus in Organic Synthesis. x. tert-Butyl Carbamate. An Efficient Additive in a Modified Curtius Reaction by Diphenyl Phosphorazidate (DPPA). 1738–1740 (1975).
 27. Meatherall, R. & Palatnick, W. Convenient Headspace Gas Chromatographic Determination of Azide in Blood and Plasma. *J. Anal. Toxicol.* **33**, 525–531 (2009).
 28. Patil, B. S., Vasanthakumar, G.-R. & Suresh Babu, V. V. Isocyanates of N alpha-[(9-fluorenylmethyl)oxy]carbonyl amino acids: synthesis, isolation, characterization, and application to the efficient synthesis of urea peptidomimetics. *J. Org. Chem.* **68**, 7274–7280 (2003).
 29. Fischer, L. *et al.* Succinimidyl carbamate derivatives from N-protected α -amino acids and dipeptides-synthesis of ureidopeptides and oligourea/peptide hybrids. *European J. Org. Chem.* 2511–2525 (2007).
 30. Lin, H.-S. & Paquette, L. a. A Convenient Method for Determining the Concentration of Grignard Reagents. *Synth. Commun.* **24**, 2503–2506 (1994).
 31. Chowdhury, S. & Roy, S. The First Example of a Catalytic Hunsdiecker Reaction: Synthesis of B-Halostyrenes. *J. Org. Chem.* **62**, 199–200 (1997).
 32. Armarego, W. L. . & Perrin, D. . Purification of Laboratory Chemicals. *Molecules* **2**, 152 (1997).
 33. Vogel, A. I. Vogel's textbook of practical organic chemistry. 5th edn. longman scientific & technical **14**, (1990).
 34. Walla, P. & Kappe, C. O. Microwave-assisted Negishi and Kumada cross-coupling reactions of aryl chlorides. *Chem. Commun. (Camb)*. 564–5 (2004).

35. Lin, H.-S. & Paquette, L. a. A Convenient Method for Determining the Concentration of Grignard Reagents. *Synth. Commun.* **24**, 2503–2506 (1994).